

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE MEDICINA DE LISBOA



ESTABILIDADE DA COCAÍNA NO SANGUE:
ESTUDO E OTIMIZAÇÃO

CATARINA ISABEL MARTINS MOURATO

Orientadora

Mestre Maria Suzel Costa de Sousa, Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses, I.P.

Coorientador

Prof. Doutor Jorge Costa Santos, Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa

Dissertação especialmente elaborada para obtenção do grau de Mestre em
Medicina Legal e Ciências Forenses

2016

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE MEDICINA DE LISBOA



ESTABILIDADE DA COCAÍNA NO SANGUE:
ESTUDO E OTIMIZAÇÃO

CATARINA ISABEL MARTINS MOURATO

Orientadora

Mestre Maria Suzel Costa de Sousa, Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses, I.P.

Coorientador

Prof. Doutor Jorge Costa Santos, Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa

Entidade Parceira

Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses, I.P

Dissertação especialmente elaborada para obtenção do grau de Mestre em
Medicina Legal e Ciências Forenses

2016

Todas as afirmações efetuadas no presente documento são da exclusiva responsabilidade do seu autor, não cabendo qualquer responsabilidade à Faculdade de Medicina de Lisboa pelos conteúdos nele apresentados.

A impressão desta dissertação foi aprovada pelo Conselho Científico da Faculdade de Medicina de Lisboa em reunião de 18 de Outubro de 2016.

O sonho é a pior das cocaínas, porque é a mais natural de todas.

Fernando Pessoa *in* “Livro do Desassossego”

A parte experimental deste trabalho decorreu no Serviço de Química e Toxicologia Forense da Delegação Sul do Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses, I.P.

I. ÍNDICE

I. ÍNDICE	6
II. AGRADECIMENTOS	10
III. RESUMO	12
IV. ABSTRACT	15
V. INTRODUÇÃO	18
1. Dificuldades inerentes às análises toxicológicas	20
2. Estabilidade dos analitos nas amostras biológicas	21
3. Caso de estudo: a cocaína	23
3.1. Estrutura química	25
3.2. História	26
3.3. Formas da cocaína e sua produção	28
3.4. Farmacodinâmica	30
3.5. Farmacocinética	32
3.6. Toxicidade	39
3.7. Efeitos patológicos	41
3.8. Determinação analítica em amostras biológicas	43

3.9. Estabilidade da cocaína nas amostras biológicas	52
VI. OBJETIVOS DO TRABALHO	61
VII. MATERIAL E MÉTODOS	63
1. Padrões e Reagentes	63
2. Soluções	64
3. Equipamentos	66
4. Materiais	66
5. Amostras biológicas estudadas	67
6. Estudos de estabilidade da cocaína	68
6.1. Estudo do efeito da concentração inicial de cocaína, do conservante, temperatura e tempo de armazenamento na estabilidade da cocaína ...	69
6.2. Estudo do efeito do ácido ascórbico, temperatura e tempo de armazenamento na estabilidade da cocaína	70
6.3. Estudo da estabilidade de cocaína após ciclos de congelação/ descongelação	72
6.4. Estudo da estabilidade de cocaína em extratos derivatizados	74
6.5. Análise estatística	75
7. Métodos analíticos	75
7.1. Preparação das amostras biológicas	75
7.2. Análise por cromatografia gasosa e espectrometria de massa	77

7.3. Preparação das curvas de calibração utilizadas na quantificação da cocaína, benzoilecgonina e ecgonina metil éster	78
7.4. Preparação das amostras do controlo de qualidade interno.....	79
7.5. Critérios de aceitação das curvas de calibração, de controlo de qualidade interno e de identificação dos analitos.....	80
VIII. RESULTADOS E DISCUSSÃO	83
1. Estudo do efeito da concentração inicial de cocaína, do conservante, temperatura e tempo de armazenamento na estabilidade da cocaína	83
1.1. Sangue <i>post mortem</i>	83
1.2. Sangue <i>in vivo</i>	87
1.3. Efeito do pH nas amostras de sangue <i>post mortem</i> vs <i>in vivo</i>	92
2. Estudo do efeito do ácido ascórbico, temperatura e tempo de armazenamento na estabilidade da cocaína	93
2.1. Sangue <i>post mortem</i>	93
2.2. Sangue <i>in vivo</i>	96
2.3. Efeito do pH nas amostras de sangue <i>post mortem</i> vs <i>in vivo</i>	99
3. Estudo da estabilidade da cocaína após ciclos de congelação/descongelação	100
4. Estudo da estabilidade da cocaína em extratos derivatizados.....	102
IX. CONCLUSÕES	104
X. PERSPETIVAS FUTURAS.....	107

XI. DIVULGAÇÃO NA COMUNIDADE CIENTÍFICA.....	109
1. Comunicações em painel.....	109
2. Comunicações orais.....	109
XII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	110
XIII. ANEXOS.....	133
1. Exemplo de cromatograma obtido durante o estudo por SPE-GC-MS	133
2. Quantificação por regressão linear	134
3. Índice de figuras.....	135
4. Índice de tabelas.....	137
5. Lista de abreviaturas e acrónimos	138
6. Lista de unidades	140

II. AGRADECIMENTOS

À Mestre Suzel Costa, Especialista Superior do Serviço de Química e Toxicologia da Delegação Sul do Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses, I.P., orientadora desta dissertação, por todos os ensinamentos, pelo incentivo e coragem, pela paciência nos momentos mais difíceis, pela confiança, pela amizade. Muito obrigada!

Ao Prof. Doutor Jorge Costa Santos, Professor da Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa, pelos seus ensinamentos durante a parte curricular do mestrado e pela coorientação da dissertação.

Ao Mestre Mário João Dias, Assessor de Medicina Legal Principal do Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses, I.P., pela sua disponibilidade, tolerância e ajuda durante todo o trabalho.

A todos os que trabalham no Serviço de Química e Toxicologia Forense da Delegação Sul do Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses, I.P. pela boa disposição e disponibilidade durante todo o trabalho.

Aos meus colegas de mestrado, nomeadamente ao Tiago e à Inês, pelo companheirismo, ajuda e amizade.

II. AGRADECIMENTOS

A todos os amigos que me acompanham sempre, pela sua paciência e tolerância durante esta etapa importante.

À Margarida, à Ana e ao Tiago pela amizade construída no meio da Biologia!

À Ana e à Joana pelo apoio nesta fase importante, tal como nos últimos 14 anos. Obrigada pela amizade!

Ao Tiago pelo amor, motivação e, acima de tudo, por não me deixar desistir dos sonhos.

À minha madrinha pela infinita paciência, apoio na revisão da dissertação e, mais importante do que tudo, por estar sempre presente.

À minha família pela constante força e boa disposição.

Aos meus irmãos, Ana, Susana e João, por poder contar sempre convosco.

Aos meus pais por permitirem que realize os meus sonhos, pela imensa paciência e tolerância, pela coragem e incentivo, pela compreensão e ajuda. Obrigada por tudo!

III. RESUMO

A otimização da análise toxicológica da cocaína revela-se importante, visto que é um composto muito sensível a diversos mecanismos de hidrólise, que podem dificultar a interpretação dos resultados analíticos. Neste estudo, avaliou-se a estabilidade da cocaína em amostras de sangue, tendo em conta fatores como a temperatura de conservação, o tempo de armazenamento, a concentração inicial do analito nas amostras e o efeito da adição dos conservantes fluoreto de sódio e ácido ascórbico.

Amostras de sangue *post mortem* e *in vivo* fortificadas com cocaína nas concentrações de 100 e 1000 ng/mL, sem ou com fluoreto de sódio e ácido ascórbico, foram mantidas a três temperaturas: ambiente, de refrigeração (2-8°C) e de congelação (-10°C). As análises das amostras foram realizadas aos 0, 1, 7, 14, 21, 28, 42, 64 e 93 dias após o armazenamento. Foi ainda avaliada a estabilidade de cocaína em amostras de sangue sujeitas a três ciclos de congelação/descongelação e em extratos derivatizados. A quantificação da cocaína, benzoilecgonina e ecgonina metil éster foi efetuada nas amostras após extração em fase sólida de troca catiónica, seguida por derivatização com MSTFA-TMCS e análise por cromatografia gasosa e espectrometria de massa em modo de monitorização seletiva de iões (SIM).

A concentração de cocaína inicial nas amostras não influenciou a sua estabilidade, ao contrário do tempo de armazenamento e da temperatura de conservação. A temperatura de congelamento (-10°C) assegurou uma boa estabilidade, pois inibiu quase totalmente a degradação da cocaína durante o período total do estudo, sendo que a perda de cocaína variou entre 9% e 27% no caso das amostras de sangue *post mortem* e entre 24% e 31% nas amostras *in vivo*, ao fim de 93 dias de armazenamento. Estes valores contrastaram com os observados nas amostras mantidas à temperatura ambiente em que houve perda total da cocaína ao fim de 64 e 28 dias de armazenamento nas amostras de sangue *post mortem* e *in vivo*, respetivamente.

Nas amostras de sangue *post mortem* a degradação da cocaína foi inferior à observada nas amostras de sangue *in vivo*. Esta diferença deveu-se provavelmente ao valor de pH das amostras, em que no caso do sangue *post mortem* foi de 6,68 e do sangue *in vivo* de 7,38, evidenciando a estabilidade da cocaína em amostras ácidas. A acidificação das amostras de sangue com ácido ascórbico favoreceu a estabilidade da cocaína, em particular, à temperatura ambiente e de refrigeração (2-8°C). Aos 93 dias de armazenamento, no caso das amostras *in vivo* que continham ácido ascórbico detetou-se 92% de cocaína, contrastando com o valor de 64% obtido para as amostras sem ácido ascórbico.

A adição do ácido ascórbico às amostras de sangue permitiu diminuir a formação de benzoilecgonina em todas as temperaturas estudadas, enquanto o fluoreto de sódio minimizou a degradação enzimática da cocaína em ecgonina metil éster.

A conservação das amostras de sangue à temperatura de congelamento (-10°C) combinada com a adição de 0,02 g/mL de fluoreto de sódio e 3 mg/mL de ácido ascórbico assegurou a estabilidade da cocaína durante pelo menos 93 dias, sendo a primeira vez que o ácido ascórbico foi utilizado como conservante da cocaína em amostras de sangue.

Os ciclos de congelamento/descongelamento afetaram a estabilidade da cocaína nas amostras de sangue ($p < 0.05$). No entanto, a cocaína revelou-se estável em extratos derivatizados durante pelo menos 8 dias ($p > 0.05$).

PALAVRAS-CHAVE: cocaína, estabilidade, sangue, extração em fase sólida, cromatografia gasosa, espectrometria de massa.

IV. ABSTRACT

The analysis of cocaine optimization is particularly important because cocaine is an unstable compound, sensible to several hydrolysis mechanisms, which can difficult the interpretation of the analytic results. In this study, the cocaine stability was evaluated in whole blood samples, taking into account important factors, such as storage time and temperature, drug concentration and the effect of sodium fluoride and ascorbic acid preservatives addition.

Post mortem and *in vivo* blood samples spiked with cocaine in order to obtain 100 and 1000 ng/mL concentrations without or with sodium fluoride and ascorbic acid were kept at three temperatures: room temperature, in the refrigerator (2-8°C) and freezer (-10°C). The analysis were performed on the 0, 1st, 7th, 14th, 21st, 28th, 42nd, 64th and 93rd days of storage. The cocaine stability was also evaluated in blood samples after three freezing/melting cycles and in derivatized extracts. Cocaine, benzoylecgonine and ecgonine methyl ester quantification was performed in samples extracted from the cation exchange solid phase extraction followed by MSTFA-TMCS derivatization and analysis by gas chromatography-mass spectrometry in selective ion monitoring mode (SIM).

The cocaine initial concentration had no influence on its stability, contrasting with storage temperature and time. Freezer temperature ensured a good stability,

because as it almost totally inhibited cocaine degradation. Cocaine loss ranged between 9% and 27% in *post mortem* samples and ranged between 24% and 31% in *in vivo* samples, after 93 days of storage. These values contrasted with those observed in samples kept at room temperature, where there was total cocaine loss after 64 and 28 days of storage in *post mortem* and in *in vivo* samples, respectively.

In post mortem blood samples the cocaine degradation was lower than in *in vivo* blood samples. This difference was probably due to the samples pH value, which in the case of *post mortem* blood was 6,68 and *in vivo* blood was 7,38, demonstrating the cocaine stability in acid samples.

The acidification of blood samples with ascorbic acid promoted cocaine stability, in particular, at room and refrigerator (2-8°C) temperatures. Following 93 days of storage, 92% of cocaine was detected in *in vivo* samples that contained ascorbic acid, contrasting with the 64% value observed in samples without ascorbic acid.

The addition of ascorbic acid to the blood samples allowed a decrease in benzoilecgonine formation, while sodium fluoride inhibited cocaine enzymatic degradation in ecgonine methyl ester.

The blood samples storage at freezer temperature (-10°C) combined with 0,02 g/mL sodium fluoride and 3 mg/mL ascorbic acid ensured cocaine stability during at least 93 days, this being the first time that ascorbic acid was used as preservative for cocaine in blood samples.

The freezing/melting cycles affected cocaine stability in blood samples ($p < 0,05$). However, cocaine was stable in the derivatized extracts during at least 8 days ($p > 0,05$).

KEYWORDS: cocaine, stability, blood, solid phase extraction, gas chromatography, mass spectrometry.

V. INTRODUÇÃO

Os resultados toxicológicos são de extrema relevância no contexto médico-legal porque constituem um importante meio de prova. Já Orfila (1787-1853), aquando da publicação do Tratado Geral de Toxicologia (1814), referenciou que “o toxicologista horrorizado pelo crime de envenenamento homicida tem de procurar aperfeiçoar os processos para revelar o crime e ajudar o magistrado a punir o culpado”.

Para assegurar a eficiência dos resultados toxicológicos enquanto meio de prova é essencial a otimização e validação dos métodos analíticos para que se consigam efetuar análises toxicológicas rigorosas, tanto qualitativa como quantitativamente. Resultados analíticos duvidosos podem conduzir a falsas interpretações e, conseqüentemente, a conclusões menos corretas, o que, no pior dos casos, pode resultar em conseqüências legais indevidas para o acusado (Peters, 2007).

A toxicologia forense no âmbito médico-legal integra dois tipos de análises: as análises *post mortem* e as análises *in vivo*.

A análise toxicológica *post mortem* é importante nas situações de morte de etiologia médico-legal accidental, homicida, suicida, natural ou desconhecida e tem por objetivo avaliar em que medida as circunstâncias e/ou causa de morte poderão estar

relacionadas com os efeitos de um fármaco, droga ou outra substância química no organismo (Bertol *et al.*, 2008; Darke & Duflou, 2008; Simonsen *et al.*, 2011). O resultado da análise toxicológica *in vivo*, nomeadamente no âmbito da fiscalização da condução sob influência de substâncias psicoativas é, de acordo com o Decreto-Lei 44/2005 de 23 de Fevereiro (Código da Estrada), a Lei 18/2007 de 17 de Maio e a Portaria 902B/2007 de 13 de Agosto, um elemento de prova essencial à investigação das circunstâncias do acidente, nomeadamente nos casos em que resultaram feridos graves ou mortos.

Embora as metodologias analíticas atualmente disponíveis permitam uma elevada fiabilidade nos resultados obtidos, existem dificuldades inerentes à análise toxicológica que podem influenciar a interpretação dos resultados analíticos. São disso exemplos a possibilidade de ocorrência de falsos resultados positivos ou negativos, bem como a dificuldade de estabelecer uma relação direta entre a concentração das substâncias nas matrizes biológicas e os efeitos observados no indivíduo (Skopp, 2010; Schütz *et al.*, 2003).

Cientes destes factos, muitos toxicologistas têm tomado diversas medidas para garantir a qualidade dos métodos analíticos utilizados nos laboratórios, tais como a otimização e validação de métodos cada vez mais sensíveis e exatos. Contudo, mesmo os métodos mais sensíveis, exatos e precisos apenas fornecem informações que refletem as condições das amostras biológicas no momento da análise. Dependendo das condições e duração de transporte, conservação e/ou de manuseamento, a concentração das substâncias de interesse na matriz pode alterar-se consideravelmente entre o momento da colheita e o da análise. Estas possíveis

discrepâncias entre as concentrações existentes no momento da colheita e no momento da análise toxicológica devem ser tidas em consideração na interpretação dos resultados. Por esta razão, tal como para todos os parâmetros necessários à validação de métodos de análise (e.g. limites de deteção e de quantificação, precisão intermédia, exatidão, linearidade) é essencial conhecer a estabilidade das substâncias em matrizes biológicas sujeitas a determinadas condições de manuseamento, conservação e análise (Jemionek, 2010; Peters, 2007; Shah *et al.*, 2000).

1. Dificuldades inerentes às análises toxicológicas

Nas diferentes fases da análise toxicológica são diversos os fatores responsáveis por alterações suscetíveis de influenciar o resultado final. Enquanto no caso da análise de amostras biológicas *in vivo* estas alterações devem-se principalmente às condições de colheita, transporte e conservação das amostras, em relação à análise toxicológica de amostras *post mortem* acrescem fatores, tais como, a formação e a redistribuição *post mortem* das substâncias. Estes fatores, em conjugação com a farmacocinética e farmacodinâmica das substâncias na fase agónica *post mortem* podem dificultar a interpretação das concentrações dos analitos e seus metabolitos ao momento da morte (Allan & Roberts, 2008; Drummer, 2004; Skopp, 2010).

Os fatores que podem influenciar a estabilidade dos analitos e consequentemente os resultados toxicológicos, podem ser diferenciados temporalmente, entre aqueles que ocorrem na fase pré-analítica e na fase analítica.

A primeira é fundamental para a qualidade dos resultados, sendo que envolve etapas muito importantes tais como a colheita do material biológico e sua conservação, transporte e preparação para a análise. A fase analítica pode conduzir também a alterações da concentração dos analitos, devido nomeadamente aos possíveis erros inerentes aos métodos analíticos usados (e.g. precisão, exatidão, robustez) como, por exemplo, a extração dos analitos da matriz (e.g. recuperação) e os métodos cromatográficos hifenados (e.g. sensibilidade, arrastamento). No entanto, os fatores que mais interferem na estabilidade dos analitos nas amostras biológicas são: o tipo de amostra (e.g. sangue, urina, humor vítreo), os procedimentos utilizados na sua recolha (e.g. o local anatómico de colheita, materiais e acondicionamento), as condições de transporte e conservação das amostras (e.g. tempo de armazenamento, temperatura de conservação, pH, conservantes adicionados), ou o tempo decorrido entre o momento da colheita e o da análise (Drummer & Gerastamoulos, 2002; Richardson, 2000; Schütz *et al.*, 2003; Skopp, 2004).

2. Estabilidade dos analitos nas amostras biológicas

A estabilidade é definida como a capacidade de uma amostra biológica manter a concentração inicial de um analito durante um determinado período de tempo dentro de limites específicos, quando sujeita a determinadas condições de conservação (Dadgar & Burnett, 1995; Hartmann *et al.*, 1998; Peters, 2007; Peters *et al.*, 2007; Shah *et al.*, 2000).

Segundo Peters (2007), podem ser definidos quatro tipos de estabilidade:

1) Estabilidade que deve ser estabelecida sob condições de armazenamento utilizando os mesmos recipientes de acondicionamento das amostras, a mesma temperatura e um período de armazenamento não inferior ao esperado para amostras de rotina. Este tipo de estabilidade é importante para se determinar a necessidade de utilização de conservantes para prevenir a degradação do analito de interesse e/ou a formação de outros analitos ou artefactos durante a preparação das amostras;

2) Estabilidade observada em ciclos de congelação/descongelação, tendo como objetivo reproduzir a rotina laboratorial, durante a qual as amostras são congeladas e descongeladas diversas vezes para reanálise. Em regra, é recomendado que no estudo deste tipo de estabilidade sejam efetuados pelo menos três ciclos de congelação/descongelação;

3) Estabilidade em processo que consiste na estabilidade do analito durante a preparação das amostras, durante a qual existem fatores interferentes como a temperatura ambiente e o tempo;

4) Estabilidade em amostras processadas onde é avaliada a estabilidade do analito em extratos sujeitos às condições do equipamento utilizado na análise instrumental durante um determinado período de tempo, no mínimo o correspondente a um ciclo analítico. Revela-se particularmente importante nos casos em que ocorrem atrasos inesperados durante a análise devidos, por exemplo, a uma avaria do equipamento e consequente interrupção da sequência analítica.

A estabilidade do analito deve ser considerada como um processo dinâmico em que o resultado final depende da velocidade relativa de duas reações: a degradação do analito e a formação dos produtos da sua degradação (metabólitos e/ou artefactos).

Para que se efetue um estudo de estabilidade mais completo é essencial que a análise dos resultados destes estudos não se limite apenas à avaliação da degradação do analito, mas também à formação de metabolitos e/ou artefactos resultantes da sua degradação (Dadgar & Burnett, 1995; Hartmann *et al.*, 1998; Peters, 2007; Peters *et al.*, 2007; Shah *et al.*, 2000).

Com vista à uniformidade nos estudos de estabilidade, têm sido divulgadas algumas recomendações importantes. A estabilidade deve ser testada por comparação dos resultados obtidos em amostras controlo e em amostras sujeitas às condições de avaliação da estabilidade. É recomendado que nestes trabalhos se utilizem pelo menos duas concentrações diferentes do analito (na gama de trabalho baixa e alta) e a análise de replicados. Revela-se também bastante importante o planeamento rigoroso dos estudos de estabilidade e a uniformização de critérios de aceitação dos resultados obtidos (Dadgar & Burnett, 1995; Hartmann *et al.*, 1998; Peters, 2007; Peters *et al.*, 2007; Shah *et al.*, 2000).

3. Caso de estudo: a cocaína

Seguindo a tendência europeia, o consumo de cocaína tem aumentado nos últimos anos em Portugal, sendo a terceira substância ilícita mais consumida. No entanto, tanto nos casos de mortes por *overdose* como nos processos de contraordenação relacionados com o consumo de drogas esta substância surge já em segundo lugar (EMCDDA, 2013; EMCDDA, 2015; SICAD, 2012; SICAD, 2013; UNODC, 2014; UNODC, 2015).

Nos resultados toxicológicos obtidos para a pesquisa da cocaína é frequente a presença dos seus metabolitos major (benzoilecgonina e ecgonina metil éster), não se detetando em muitos casos a presença de cocaína ou quando detetada a mesma apresenta concentrações muito baixas. Este facto pode ser explicado essencialmente por quatro fatores: 1) existência de diversos mecanismos de hidrólise a que esta substância está sujeita *in vivo* e *in vitro*; 2) ao tipo de matriz biológica (e.g. sangue, urina, humor vítreo); 3) ao tempo que decorre entre o momento da morte ou consumo da substância (no âmbito de fiscalização de condutores) e a colheita da amostra; 4) ao tempo decorrido entre a colheita da amostra e a análise.

A conjugação destes fatores conduz a que, na maioria das vezes, a intoxicação por cocaína seja inferida a partir da presença dos seus metabolitos major. No entanto, esta inferência tem de ser efetuada cautelosamente, visto que não é possível relacionar as concentrações destes metabolitos no momento da análise com as concentrações de cocaína *peri mortem*. Nos casos *post mortem*, em que o intervalo de tempo ocorrido entre a morte e a recolha das amostras pode ser elevado torna-se ainda mais difícil esta determinação devido a todos os processos de degradação e redistribuição que ocorrem durante esse período. Relacionar as concentrações de benzoilecgonina e ecgonina metil éster com a toxicidade da cocaína é ainda incorreto, porque, ao contrário da cocaína, estes metabolitos são substâncias inativas. Por estas razões, a presença destes compostos na ausência de cocaína não demonstra totalmente que um indivíduo estava sob os efeitos da mesma na altura da morte (Butzbach, 2010; Karch & Stephens, 1998; Logan *et al.*, 1997; Pasanen *et al.*, 1995; Pélissier-Alicot *et al.*, 2003; Warner & Norman, 2000).

O facto de não existirem valores de referência relativamente à concentração e rácios dos metabolitos presentes nas matrizes biológicas é um fator que também dificulta a atribuição direta da causa de morte. O caso do consumo concomitante de cocaína e etanol é uma situação que conduz a diferenças nas concentrações dos metabolitos major. Isto deve-se ao facto de, neste caso, ser produzido cocaetileno, um metabolito que é formado por ação da mesma enzima responsável pela formação de benzoilecgonina e, por essa razão, diminui a concentração desta última (Chasin & Mídio, 2000; Harris *et al.*, 2003; Jeffcoat *et al.*, 1989).

Por estas razões, o estudo e a otimização das condições de colheita, conservação e análise das amostras revelam-se particularmente importantes para estabilizar a concentração de cocaína.

3.1. Estrutura química

A cocaína (Figura 1), ou metilbenzoilecgonina, é um éster composto por metilecgonina e ácido benzóico. A ligação éster é rapidamente hidrolisada pelas colinesterases presentes no plasma, que contribuem para a semi-vida reduzida da molécula (Goldstein *et al.*, 2009; Isenschmid, 2010).

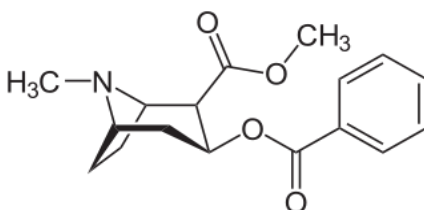


Figura 1 - Estrutura química da cocaína.

É uma molécula lipofílica que possui uma parte hidrofóbica e outra hidrofílica separadas por uma ligação éster. A região hidrofóbica integra a parte do ácido benzóico, enquanto as características hidrofílicas são atribuídas pela metilecgonina (Goldstein *et al.*, 2009; Isenschmid, 2010).

Estas características lipofílicas permitem que atravesse facilmente a barreira hematoencefálica o que lhe confere uma toxicidade elevada apesar de possuir uma semi-vida reduzida (Goldstein *et al.*, 2009; Isenschmid, 2010).

3.2. História

A cocaína é um alcalóide com ação estimulante que está presente nomeadamente nas plantas *Erythroxylum coca* (Figura 2) e *Erythroxylum novogranatense*, as quais crescem essencialmente no norte dos Andes (América do Sul) e, embora numa extensão menor, na Índia, África e Indonésia. O crescimento destas plantas é favorecido por elevadas altitudes e as suas folhas só devem ser colhidas



Figura 2 - *Erythroxylum coca*¹.

cerca de 2 anos após o cultivo. Posteriormente podem ser colhidas até três vezes por ano. As folhas são secas e convertidas numa pasta que poderá ser utilizada na produção de cloridrato de cocaína, sendo que a partir de 100 kg de folhas de *coca* é produzido 1 kg de pasta de *coca* ou 80 g de cloridrato de cocaína (Isenschmid, 2010).

¹ Retirado de <http://www.drugabuse.gov/publications/research-reports/cocaine-abuse-addiction>.

A cocaína é uma substância psicoativa utilizada desde há 2000 anos. Os Incas do Peru mastigavam as folhas de coca nas suas cerimónias religiosas e durante a conquista espanhola, os espanhóis observaram que os índios peruanos não conseguiam realizar o trabalho mais pesado quando eram privados desta planta (Boghdadi & Henning, 1997; Goldstein *et al.*, 2009; Isenschmid, 2010).

Em meados do século XIX, Albert Niemann foi a primeira pessoa a conseguir extrair cocaína das folhas da planta. A partir dos anos 60, a cocaína foi incluída em vários elixires e tónicos, incluindo a Coca-cola original, em que cada garrafa continha 9 mg de cocaína (Boghdadi & Henning, 1997; Goldstein *et al.*, 2009; Isenschmid, 2010).

O neurologista Paolo Mantegazza foi o primeiro a interessar-se pela aplicação da cocaína na medicina, sendo que Carl Koller tornou-se o primeiro oftalmologista a utilizar a cocaína como anestésico numa cirurgia (Isenschmid, 2010).

Embora Freud tivesse administrado cocaína a muitos dos seus doentes, só após a morte de um amigo, a quem lhe tinha sido prescrita esta substância como tratamento da dependência de morfina, é que foram admitidos os elevados riscos para a saúde inerentes ao seu consumo (Boghdadi & Henning, 1997; Goldstein *et al.*, 2009; Isenschmid, 2010).

Em 1914, dado que o consumo abusivo desta substância começou a ser visto como um problema de saúde pública, foi classificada pela *Harrison ACT* como um narcótico, apesar de ser um estimulante do sistema nervoso central, o que permitiu regular o seu consumo (Goldstein *et al.*, 2009; Isenschmid, 2010).

Atualmente é uma das substâncias ilícitas de maior consumo a nível mundial (UNODC, 2015). Para além dos efeitos para a saúde, nomeadamente os associados ao consumo crónico, também os problemas relacionados com o tráfico desta substância são de extrema importância para a sociedade. No tráfico de substâncias ilícitas são diversas as formas utilizadas: aquelas em que as pessoas envolvidas no transporte ingerem recipientes com elevadas quantidades de cocaína que são recuperados através da defecação (*bodypackers*) e outras em que apenas ocultam esses recipientes em orifícios anatómicos (*bodystuffers*). Muitas das vezes, ocorre rutura desses recipientes ficando o organismo exposto a concentrações muito elevadas da substância com consequências fatais na maioria dos casos (Fineschi *et al.*, 2002; Koehler *et al.*, 2005; Norfolk, 2007; Pidoto *et al.*, 2002).

3.3. Formas da cocaína e sua produção

A cocaína encontra-se normalmente sob duas formas: o cloridrato de cocaína e a cocaína livre (*crack*).

O cloridrato de cocaína (Figura 3A) pode ser produzido por métodos artesanais ou industriais. Artesanalmente obtém-se a pasta de coca através do tratamento das folhas da planta com uma solução alcalina forte diluída à qual é adicionada gasolina e um ácido. Esta pasta pode ser então tratada com ácido clorídrico, para que seja formado o cloridrato de cocaína. Industrialmente este sal obtém-se através do



Figura 3 - Formas da cocaína: cloridrato (A) e livre (B).²

isolamento e hidrólise dos alcalóides do tipo ecgonina presentes nas folhas da planta, seguido da adição do anidrido benzóico e iodeto de metilo para esterificação dos alcalóides. O cloridrato de cocaína é um pó branco cristalino que é bem absorvido através da mucosa nasal, sendo, por isso, uma das vias de administração mais utilizadas. Por ser bastante solúvel em água pode ser administrado por via intravenosa. O cloridrato de cocaína não é geralmente fumado, uma vez que apresenta um ponto de fusão de 195°C, degradando-se por pirólise (Boghdadi & Henning, 1997; Favrod-Coune & Broers, 2010; Goldstein *et al.*, 2009; Isenschmid, 2010; Kidwell & Athanaselis, 2005; White & Lambe, 2003).

A cocaína livre (Figura 3B), ou *crack*, é obtida através de um processo mais complexo que o anterior. É produzida por precipitação a partir da dissolução do cloridrato de cocaína em água, seguida da adição de uma solução saturada de bicarbonato de sódio ou amônia. Esta forma é insolúvel em água, sendo no entanto solúvel em solventes orgânicos. O nome *crack* deriva do som, que faz lembrar uma rocha a estalar, que se produz quando esta substância é aquecida para ser inalada, forma mais comum de consumo (Boghdadi & Henning, 1997; Favrod-Coune & Broers,

² Adaptado de <http://www.drugabuse.gov/publications/research-reports/cocaine-abuse-addiction>.

2010; Goldstein *et al.*, 2009; Isenschmid, 2010; Kidwell & Athanaselis, 2005; White & Lambe, 2003).

3.4. **Farmacodinâmica**

A cocaína desencadeia ações muito complexas no sistema nervoso central e periférico, atuando nos neurónios bloqueando a recaptação das catecolaminas e os canais de sódio existentes nas membranas dos nervos periféricos.

Os efeitos no sistema nervoso central resultam da ação da cocaína ao nível das catecolaminas, nomeadamente dopamina, serotonina e noradrenalina, que estão diretamente envolvidas na expressão dos comportamentos e emoções. A cocaína bloqueia o transportador de dopamina impedindo a reabsorção deste neurotransmissor por parte do neurónio pré-sináptico. A reabsorção, que é mediada pelos iões sódio e cloreto, é inibida quando a cocaína se liga ao transportador no local de ligação do sódio e altera a conformação do local de ligação do cloreto, impedindo assim a ligação de ambos os iões ao transportador de dopamina (Figura 4). O bloqueio do transportador de dopamina potencia desta forma a neurotransmissão dopaminérgica. Dado que a dopamina não consegue ultrapassar as membranas dos neurónios e ser catabolizada pela monoamina oxidase (MAO), acumula-se na fenda sináptica e estimula continuamente os recetores dopaminérgicos do neurónio pós-sináptico. Devido à estimulação intensa destes recetores, presentes nas áreas

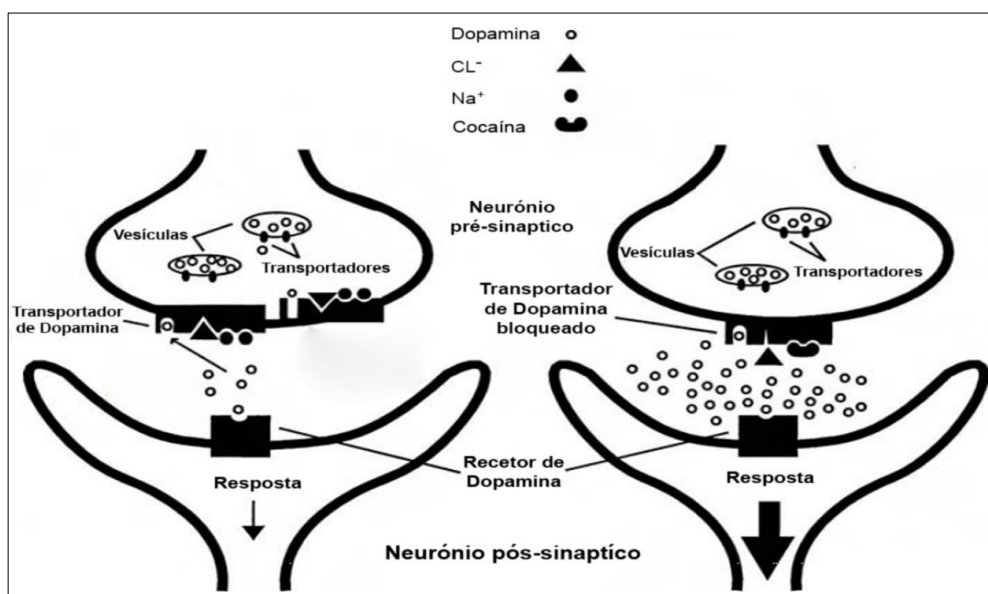


Figura 4 - Mecanismo de ação da cocaína ao nível dos locais de ligação dos íons cloreto (Cl^-) e sódio (Na^+) no transportador de dopamina.³

mesolímbica e mesocortical do cérebro, ocorre um aumento da euforia e autoconfiança, tal como a intensificação do estado de alerta (Boghdadi & Henning, 1997; Büttner *et al.*, 2003; Goldstein *et al.*, 2009; Isenschmid, 2010; Meil & Boja, 2008; Rump *et al.*, 1995; White & Lambe, 2003).

O mecanismo de ação da cocaína ao nível dos canais de sódio das membranas dos neurónios tem propriedades anestésicas. Esta substância inibe a elevada permeabilidade da membrana celular decorrente da despolarização, não permitindo a condução dos impulsos elétricos nos nervos periféricos (Figura 5). Esta inibição do potencial de ação, através do bloqueio físico dos canais de sódio, pode ocorrer sob duas vias: a via hidrofílica e a via hidrofóbica. Na primeira, a cocaína sem carga elétrica alcança o local de bloqueio através da membrana, enquanto na via hidrofóbica o local de bloqueio é alcançado através do canal de sódio. O bloqueio físico dos canais

³ Adaptado de Meil & Boja (2008).

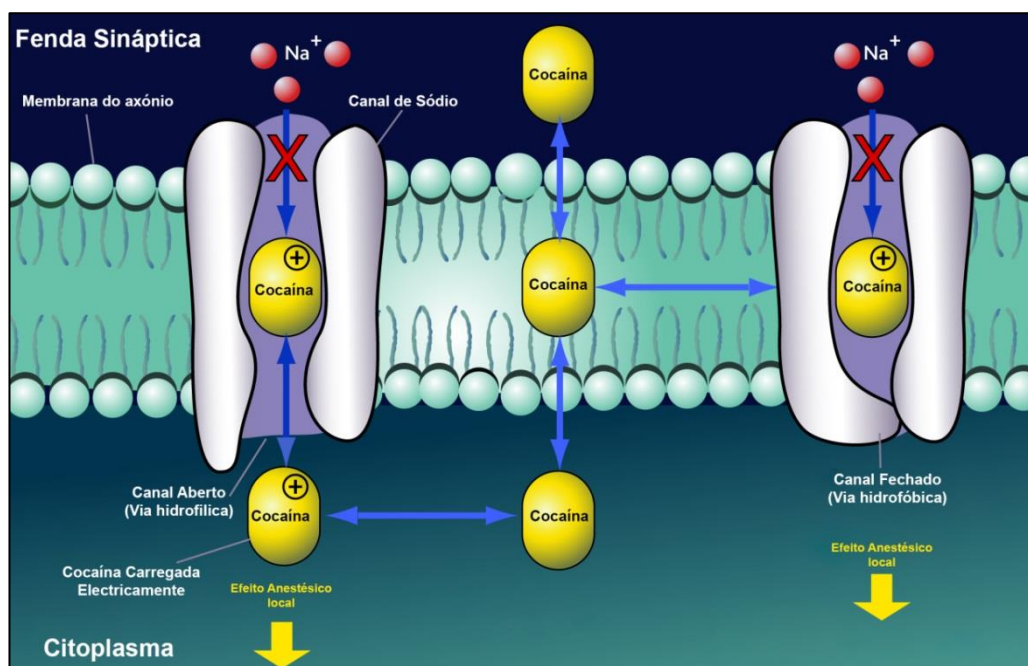


Figura 5 - Mecanismo de ação da cocaína nos canais de sódio (Na^+) da membrana dos neurônios.⁴

de sódio ocorre em grande escala a nível cardíaco. No caso de consumo de doses bastante elevadas de cocaína a despolarização é totalmente interrompida podendo ocorrer paragem cardíaca e, consequentemente, a morte (Boghdadi & Henning, 1997; Goldstein *et al.*, 2009; Isenschmid, 2010; Rump *et al.*, 1995).

3.5. Farmacocinética

A farmacocinética da cocaína é dependente da forma de cocaína consumida, da via de administração, do consumo concomitante de outras substâncias (e.g. álcool), para além das características individuais do consumidor (Goldstein *et al.*, 2009).

⁴ Adaptado de http://www.cnsforum.com/imagebank/item/therapy_cocaine/default.aspx.

3.5.1. Vias de administração, absorção, biodisponibilidade e distribuição

A cocaína pode ser consumida por diversas vias (e.g. intravenosa, respiratória: intranasal e pulmonar), através das quais esta substância é difundida por todo o organismo.

Regra geral, esta substância é rapidamente absorvida independentemente da via de administração, à exceção da ingestão e da aplicação na pele. No caso da aplicação cutânea o atraso da absorção deve-se à sua ação vasoconstritora, sendo que quando é administrada por via oral este atraso é resultante do tempo que é necessário para atingir o estômago distal ou o duodeno (Cone, 1998; Goldstein *et al.*, 2009; Leikin & Paloucek, 2008).

Dependendo da via de administração escolhida, a biodisponibilidade da cocaína pode variar consideravelmente, sendo cerca de 90% quando é injetada ou fumada, entre 25 e 94% quando é inalada e inferior a 30% na via oral (Cone, 1998; Goldstein *et al.*, 2009; Leikin & Paloucek, 2008).

A via de administração de cocaína influencia também o tempo necessário para a ocorrência dos seus efeitos e a duração destes, sendo quase imediatos quando a cocaína é fumada e mais duradouros quando é consumida por via intranasal. Na tabela 1 estão indicados os intervalos de tempo necessários para o início da observação dos efeitos provocados pela cocaína, para o momento em que se observam os seus efeitos máximos e a duração dos mesmos após o seu consumo pelas vias intranasal, intravenosa e pulmonar (Goldstein *et al.*, 2009; Leikin & Paloucek, 2008).

A cocaína após ser absorvida é distribuída rapidamente. A percentagem de ligação às proteínas é cerca 90% e o seu volume de distribuição pode variar entre 1,96 e 2,7 L/kg (Goldstein *et al.*, 2009; Leikin & Paloucek, 2008).

Tabela 1 - Intervalos de tempo necessários para o início da observação dos efeitos provocados pela cocaína, para o momento em que se observam os seus efeitos máximos e a duração dos mesmos após o seu consumo pelas vias de administração intranasal, intravenosa e pulmonar.

Via de administração	Início	Máximo	Duração
Intranasal	5min	15-20min	60-90min
Intravenosa	10-60s	3-5min	20-60min
Pulmonar	3-5s	1-3min	5-15min

3.5.2. Metabolismo vs Degradação *in vitro*

Como referido anteriormente, a cocaína é uma molécula que, devido às suas ligações éster, é facilmente hidrolisada. Em toxicologia forense é particularmente importante efetuar a distinção entre os mecanismos de hidrólise que ocorrem *in vivo* que integram o seu metabolismo, e aqueles ocorrem durante a fase *post mortem* ou após a colheita das amostras biológicas (*in vitro*) (Figura 6).

O metabolismo da cocaína *in vivo* compreende reações químicas e enzimáticas que resultam na formação de benzoilecgonina e ecgonina metil éster (maioritariamente), norcocaína, ecgonina, cocaetileno e anidroecgonina metil éster (Butzbach, 2010; Goldstein *et al.*, 2009; Isenschmid, 2010; Warner & Norman, 2000).

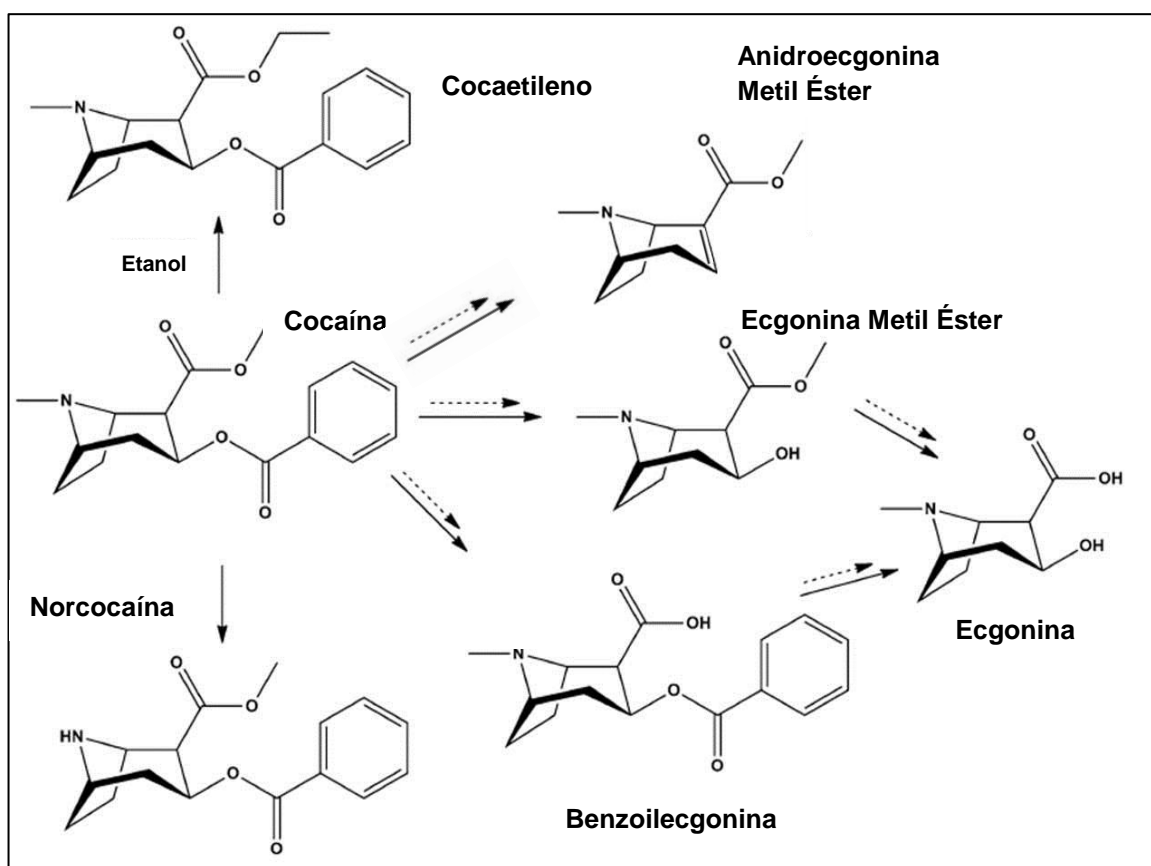


Figura 6 - Metabolitos principais resultantes do metabolismo (—————) e da degradação *post mortem* ou *in vitro* (- - - - -) da cocaína.⁵

A benzoilecgonina pode ser formada *in vivo* por duas vias: a química e a enzimática, sendo a última a predominante. A primeira ocorre espontaneamente a pH fisiológico, enquanto a via enzimática envolve a ação de esterases presentes no fígado, nomeadamente a carboxilesterase (Goldstein *et al.*, 2009; Isenschmid *et al.*, 1989; Warner & Norman, 2000).

A ecgonina metil éster é produzida *in vivo* pela degradação da cocaína apenas pela via enzimática. Esta reação é catalisada pela butirilcolinesterase, geralmente conhecida como pseudocolinesterase, que apenas se encontra presente no plasma (Goldstein *et al.*, 2009; Warner & Norman, 2000).

⁵ Adaptado de Butzbach (2010).

Quando a cocaína é consumida em associação com etanol ocorre a produção de cocaetileno através da ação da enzima que também é responsável pela transformação de cocaína em benzoilecgonina. Por esta razão, na presença de etanol a produção de benzoilecgonina é inibida. Visto ocorrer uma transesterificação da cocaína no processo de produção de cocaetileno, a carboxilesterase também é conhecida com etil-transferase (Dean *et al.*, 1991; Harris *et al.*, 2003; Laizure *et al.*, 2003; Warner & Norman, 2000).

A norcocaína, metabolito ativo da cocaína, também é produzida por via enzimática a partir da *N*-desmetilação da cocaína promovida pela ação do citocromo P450 a nível hepático. A norcocaína tem particular importância nos efeitos provocados porque pode ser convertida num metabolito hepatotóxico, o nitrato de norcocaína, que é um radical livre (Boelsterli & Göldin, 1991; Kovacid, 2005; Ndikum-Moffor *et al.*, 1998, Pasanen *et al.*, 1995). No entanto, enquanto em simultâneo a benzoilecgonina e a ecgonina metil éster podem representar até 90% da cocaína administrada, a norcocaína não excede os 5% (Goldstein *et al.*, 2009).

Tanto a benzoilecgonina como a ecgonina metil éster podem ser convertidas em ecgonina. A benzoilecgonina é convertida em ecgonina através da sua hidrólise por via enzimática, enquanto a partir da ecgonina metil éster a ecgonina se forma por hidrólise química (Skoop *et al.*, 2001).

A anidroecgonina metil éster está, regra geral, associada ao consumo da cocaína sob a forma de cocaína livre (*crack*). É um produto resultante da reação de pirólise que conduz à perda do ácido benzóico da molécula de cocaína, proporcionada

pelas temperaturas elevadas quando a cocaína é fumada (Carvalho *et al.*, 2008; Scheidweiler *et al.*, 2003). Este fenómeno é explicado pelo reduzido ponto de fusão da cocaína sob a forma livre que pode variar entre os 96°C e 98°C, relativamente ao valor de 195°C referenciado como ponto de fusão para o cloridrato de cocaína (Garcia *et al.*, 2012). A conversão da cocaína em anidroecgonina metil éster pode alcançar níveis entre 50 e 80% para temperaturas entre 255°C e os 420°C (Martin *et al.*, 1989; Nakahara & Ishigami, 1991).

Relativamente aos mecanismos de degradação *post mortem* da cocaína ou após colheita das amostras (*in vitro*), observa-se principalmente a formação de benzoilecgonina, ecgonina metil éster e ecgonina.

A formação de benzoilecgonina *post mortem* ou *in vitro* apenas ocorre por via química e é muito favorecida pelo aumento da temperatura de conservação, tempo de armazenamento e pH da amostra biológica (Baselt *et al.* 1983; Isenschmid *et al.*, 1989; Warner & Norman, 2000).

Já a degradação da cocaína em ecgonina metil éster ocorre por ação da butirilcolinesterase (pseudocolinesterase), visto que esta enzima está presente no plasma. Esta via enzimática é facilmente inibida pela diminuição da temperatura de conservação, do pH da amostra e pela adição de inibidores da butirilcolinesterase, como o fluoreto de sódio (Baselt *et al.* 1983; Berg *et al.*, 2009; Isenschmid *et al.*, 1989; Warner & Norman, 2000).

Em amostras de sangue *post mortem* ou *in vitro*, a ecgonina é formada através dos mesmos mecanismos que ocorrem *in vivo* (degradação enzimática da

benzoilecgonina e degradação química da ecgonina metil éster) (Skoop *et al.*, 2001). Contudo, no caso *post mortem* ou *in vitro* este metabolito revela-se muito importante, visto ser mais estável relativamente à cocaína, benzoilecgonina e ecgonina metil éster (Skoop *et al.*, 2001).

A formação de anidroecgonina metil éster também pode ocorrer *in vitro*, nomeadamente aquando da análise cromatográfica. Tem sido descrito que até cerca de 1% da cocaína presente na amostra pode ser convertida em anidroecgonina metil éster no bloco de injeção do cromatógrafo de gases, dado as altas temperaturas que aqui se verificam (220-250°C) e que conduzem à reação de pirólise (Godstein *et al.*, 2009; Isenschmid, 2010).

3.5.3. Semi- vida e eliminação

A semi-vida da cocaína também é dependente da via de administração utilizada, variando entre 37 e 41 min quando é consumida por via intravenosa, entre 58 e 89 min quando é fumada e entre 73 e 207 min se for administrada por via intranasal (Leikin & Paloucek, 2008).

A eliminação da cocaína e dos seus metabolitos é efetuada maioritariamente pela urina, sendo a excreção fecal uma via de eliminação pouco relevante (Goldstein *et al.*, 2009; Jeffcoat *et al.*, 1989; Leikin & Paloucek, 2008).

Normalmente, a benzoilecgonina e a ecgonina metil éster são detetadas na urina em concentrações elevadas, contrastando com o valor reduzido da cocaína na forma inalterada (inferior a 10% da cocaína administrada) (Leikin & Paloucek, 2008).

Relativamente à extensão dos metabolitos excretados, Jeffcoat *et al.* (1989) descreveram que na urina cerca 1% da dose administrada da cocaína por via intravenosa é eliminada na forma inalterada, entre 2 e 3% transforma-se em ecgonina, entre 18 e 22% em ecgonina metil éster e entre 26 e 39% em benzoilecgonina. Quando ocorre o consumo concomitante de etanol e consequente produção de cocaetileno, a formação de benzoilecgonina diminui, sendo que na urina as percentagens de cocaína, cocaetileno e benzoilecgonina são cerca de 5, 17 e 24%, respetivamente (Harris *et al.*, 2003).

3.6. Toxicidade

A suscetibilidade à cocaína é caracterizada por uma elevada variabilidade interindividual, observando-se diferentes respostas ao consumo de doses iguais (Heard *et al.*, 2008; Yamada *et al.*, 2005).

Tem sido descrito que a concentração de cocaína no sangue a partir da qual normalmente se começam a observar efeitos tóxicos é 0,5 mg/L (Musshoff *et al.*, 2004; Regenthal *et al.*, 2000). Gable (2004) descreveu que a concentração letal mais comum é 5 mg/L, podendo variar entre 1 e 20 mg/L (Gable, 2004). Estes valores contrastam com os observados no chamado intervalo “terapêutico” ou “normal”, que se verifica entre 0,1 e 0,3 mg/L (Molina, 2010; Regenthal *et al.*, 2000). Os intervalos referidos são aceites por diversos autores (Gable, 2004; Molina, 2010; Musshoff *et al.*, 2004; Regenthal *et al.*, 2000; Schulz *et al.*, 2012).

Dependendo da frequência do consumo desta substância podem distinguir-se dois tipos de toxicidade: aguda e crónica.

A intoxicação aguda (*overdose*) está relacionada com o consumo ocasional (pontual) de cocaína e é frequentemente mencionada como uma exposição a doses muito elevadas. Os efeitos associados a este tipo de consumo surgem principalmente associados ao sistema cardiovascular e, por essa razão, podem ser mais graves nos consumidores com a função cardiovascular comprometida, podendo mesmo conduzir à morte (Dunwiddie, 1988; Heard *et al.*, 2008; Isenscmhid, 2010).

A maioria das mortes relacionadas diretamente com o consumo de cocaína resulta da toxicidade crónica desta substância que se verifica quando o consumo é continuado (habitual). Enquanto muitas substâncias psicoativas induzem um estado de sensibilidade reduzida (tolerância) após o consumo crónico, a administração da cocaína de uma forma continuada pode levar a um aumento da sensibilidade (Dunwiddie, 1988). O consumo crónico de doses muito elevadas de cocaína, dado que não ocorre tolerância ao efeito anestésico da mesma, pode conduzir a paragem cardíaca e até mesmo a morte súbita (Dunwiddie, 1988; Heard *et al.*, 2008; Isenscmhid, 2010).

É de salientar que o consumo excessivo e crónico de cocaína ocorre frequentemente em associação com outras substâncias tal como o álcool, a heroína, entre outros (Bueis *et al.*, 2002; Leri *et al.*, 2003; McCance-Katz *et al.*, 1998). Esta associação de substâncias potencia a toxicidade e as patologias associadas ao consumo da cocaína (Leri *et al.*, 2003; McCance-Katz *et al.*, 1998).

3.7. Efeitos patológicos

Imediatamente após o consumo de cocaína observam-se efeitos como a euforia aumentada, a sensação de bem-estar, a autoconfiança intensificada, o aumento da frequência cardíaca, da pressão arterial e analgesia. No entanto, o consumo continuado desta substância desenvolve patologias que podem estar relacionadas com as vias de administração utilizadas ou diretamente ligadas ao mecanismo de ação da substância. A maioria destas patologias ocorre devido à ação anestésica local e à estimulação contínua dos neurónios promovidas pela cocaína (Boghdadi & Henning, 1997; Goldstein *et al.*, 2009; Isenschmid, 2010; White & Lambe, 2003).

O consumo de cocaína provoca dependência psicológica. Dado a duração dos efeitos provocados pela substância ser muito reduzida e a abstinência induzir sonolência, apatia, depressão, ansiedade, agitação e irritabilidade, ocorre facilmente o fenómeno de *craving*. Este fenómeno consiste no consumo compulsivo desta substância resultante do intenso desejo de repetir os efeitos de euforia e bem-estar alcançados com o consumo de cocaína (Boghdadi & Henning, 1997; Goldstein *et al.*, 2009; Isenschmid, 2010; White & Lambe, 2003).

Além da dependência psicológica grave associada ao consumo de cocaína, também pode originar inúmeras patologias. Em relação ao sistema nervoso central, este pode ser afetado pela cocaína conduzindo a fenómenos como o acidente vascular cerebral, trombose e hemorragia cerebral. A nível cardíaco, a cocaína pode originar patologias, tais como enfarte do miocárdio, arritmia e paragem cardíaca súbita. Ao nível do sistema respiratório, pode observar-se perfuração do septo nasal,

úlceras na faringe e edema pulmonar. No sistema gastrointestinal registam-se patologias, tais como a ulceração e perfuração gastroduodenal, perfuração do jejuno-íleo e do intestino grosso. O consumo elevado de cocaína pode originar insuficiência renal aguda e glomérulo-esclerose (Boghdadi & Henning, 1997; Foltin *et al.*, 1995; Foltin *et al.*, 2003; Goldstein *et al.*, 2009; Isenschmid, 2010; Rump *et al.*, 1995; Rush *et al.*, 1999; White & Lambe, 2003).

O consumo de cocaína por via intravenosa comporta ainda o risco de exposição a doenças transmissíveis por via sanguínea, tais como o Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) e a Hepatite C (Alter, 1997; Chiasson *et al.*, 1991; Irwin *et al.*, 1996; Thorpe *et al.*, 2002).

O consumo desta substância psicoativa durante a gravidez pode conduzir a complicações tanto ao nível do feto, como na criança após o nascimento. Durante a gravidez pode surgir aborto espontâneo ou o descolamento prematuro da placenta. No que respeita ao desenvolvimento fetal pode verificar-se um atraso do crescimento intrauterino, parto prematuro e anomalias congénitas. Após o nascimento, a criança pode apresentar convulsões, espasmos da artéria coronária e taquicardia pulmonar (Boghdadi & Henning, 1997; Di Giovanni & Marchetti, 2012; Isenschmid, 2010; Narkowicz *et al.*, 2013; Singer *et al.*, 1992).

Em relação aos efeitos a nível celular foi descrito que o consumo da cocaína altera a atividade e distribuição dos linfócitos, aumentando a atividade natural de destruição celular e de apoptose (Dyke *et al.*, 1986; Su *et al.*, 2003).

3.8. Determinação analítica em amostras biológicas

Existem várias metodologias de análise que podem ser utilizadas na determinação analítica da cocaína, podendo esta ser efetuada em diferentes matrizes biológicas.

Normalmente, os procedimentos de análise utilizados envolvem as etapas de preparação da amostra e da fase analítica. Na fase analítica distinguem-se as seguintes etapas: os métodos de rastreio, de confirmação e de quantificação.

3.8.1. *Amostras biológicas*

A determinação da cocaína e dos seus metabolitos pode ser efetuada em diversos tipos de amostras biológicas. As mais frequentemente utilizadas são o sangue, a urina, a saliva, o cabelo, tecidos e fluídos *post mortem* (Barroso *et al.*, 2008; Berg *et al.*, 2009; Bouzas *et al.*, 2009; Brunet *et al.*, 2008; Brunetto *et al.*, 2010; Engelhart & Jenkins, 2002; Mortier *et al.*, 2002).

Tal como acontece com outras substâncias, o sangue é a matriz biológica de eleição na determinação e quantificação da cocaína, dado permitir, regra geral, a correlação direta entre as concentrações estimadas e os efeitos tóxicos. Porém, a ausência da cocaína nesta matriz não deve excluir totalmente a possibilidade de intoxicação por esta substância, tendo em conta o tempo decorrido entre a exposição e a colheita da amostra, entre a colheita e a análise ou as condições de armazenamento (Moeller *et al.*, 1998).

A urina é uma amostra muito importante na determinação da cocaína, nomeadamente em métodos de rastreio. Visto através desta matriz não ser possível

efetuar-se a correlação direta com o estado clínico dos indivíduos, os resultados obtidos nas amostras de urina são úteis para orientar a pesquisa da cocaína no sangue. O facto da cocaína na sua forma inalterada surgir em concentrações bastante reduzidas neste tipo de matriz biológica torna necessária a pesquisa dos seus metabolitos principais (Barroso *et al.*, 2009; Cone *et al.*, 1998; Cone *et al.*, 2003; Musshoff *et al.*, 2006; Polla *et al.*, 2009; Valente *et al.*, 2012).

O cabelo é uma amostra relevante na avaliação de consumo de substâncias psicoativas, nomeadamente da cocaína, dado esta matriz permitir documentar a exposição às mesmas ao longo de diversas semanas ou meses após o consumo (Barroso *et al.*, 2008; Gallardo & Queiroz, 2008; Henderson *et al.*, 1996; Lopez *et al.*, 2010; Mercolini *et al.*, 2008; Merola *et al.*, 2010; Scheidweiler *et al.*, 2005). As substâncias são incorporadas no cabelo durante o seu crescimento através da corrente sanguínea, sendo bastante difícil a sua remoção através dos procedimentos de higiene normais. A principal limitação do cabelo como matriz biológica é a possibilidade de contaminação ambiental. Por esta razão, a Society of Hair Testing (2004) recomendou a implementação de uma etapa prévia de lavagem das amostras e a quantificação de benzoilecgonina e possíveis metabolitos, visto que estes resultam apenas do metabolismo da cocaína. Desta forma, é possível despistar os casos de contaminação ambiental e confirmar que os resultados obtidos refletem unicamente o consumo da cocaína.

A saliva tem como vantagem a sua recolha simples e não invasiva. O facto de permitir uma avaliação de um consumo de cocaína próximo do momento da recolha da amostra torna-a uma das amostras de eleição para a determinação de cocaína e

seus metabolitos na fiscalização de condutores sob efeito de substâncias psicoativas (Dolan *et al.*, 2004; Toennes *et al.*, 2005). A interpretação dos resultados obtidos após análise desta matriz encontra-se facilitada, visto que existe uma boa correlação entre as concentrações de cocaína da saliva com as verificadas no sangue e, consequentemente, com o estado clínico dos indivíduos (Barroso *et al.*, 2009; Drummer, 2005; Toennes *et al.*, 2005). Porém, o facto de o seu volume ser limitado e de se verificarem diferenças nos valores de pH da saliva resultante da elevada variabilidade interindividual, torna necessária a utilização de métodos de deteção mais sensíveis e a quantificação dos seus metabolitos principais (Barroso *et al.*, 2009; Cognard *et al.*, 2006; Toennes *et al.*, 2005; Valente *et al.*, 2012).

O suor é ocasionalmente utilizado na determinação do consumo da cocaína (Brunet *et al.*, 2008; Kacinko *et al.*, 2005; Liberty *et al.*, 2004; Moody *et al.*, 2004). O método de colheita da amostra utilizado tem por base a colocação de dispositivos em contacto com a pele. Este tipo de dispositivos permite a acumulação da substância durante diversos dias, facto que pode ser bastante útil na monitorização do consumo em pacientes que se encontram em tratamento de toxicodependência (Chawarski *et al.*, 2007; Kidwell *et al.*, 2003). As principais limitações da análise deste tipo de matriz são a baixa produção de suor e a ocorrência de falsos resultados positivos, devido à possibilidade de contaminação da pele e dos dispositivos (Kidwell & Smith, 2001; Kidwell *et al.*, 2003).

As amostras neonatais são de grande importância nos casos de avaliação do consumo de cocaína durante a gravidez ou amamentação. Além da urina e do cabelo, outras amostras podem ser sujeitas à determinação da cocaína e seus metabolitos,

tais como o mecónio, o tecido do cordão umbilical, a placenta e o líquido amniótico (Gareri *et al.*, 2006; Gray & Huestis, 2007; Winecker *et al.*, 1997). No mecónio a cocaína é quase sempre detetada em simultâneo com os seus metabolitos, sendo que as concentrações decrescem rapidamente 48h após o nascimento (Gareri *et al.*, 2006).

De entre o tipo de amostras *post mortem* frequentemente analisadas destacam-se o sangue, a urina e o humor vítreo (Duer *et al.*, 2006; Fernández *et al.*, 2006; Mackey-Bojack *et al.*, 2000). Quando o intervalo *post mortem* é prolongado ou quando a autópsia ou análise demoram a ser efetuadas a cocaína pode ser completamente hidrolisada, dificultando a análise do composto nas matrizes biológicas. O sangue periférico, normalmente o femoral, é uma boa alternativa ao sangue cardíaco nos casos *post mortem* e, em particular, num estado de decomposição avançado, dado que esta matriz não é tão afetada pelos fenómenos de redistribuição e putrefação *post mortem*. A urina é uma amostra biológica limitada nos casos *post mortem*, visto que não existe na maioria dos casos ou, existindo, o seu volume é em geral reduzido. O humor vítreo demonstra ser a matriz *post mortem* menos suscetível à redistribuição e putrefação *post mortem* em muito devido à sua localização anatómica (Duer *et al.*, 2006).

3.8.2. Métodos de rastreio

Os imunoensaios são muito utilizados como método de rastreio, sendo caracterizados pela sua simplicidade de execução, por possibilitarem a realização de um número elevado de análises num intervalo de tempo reduzido, pelo seu baixo custo por análise e pela elevada sensibilidade. Devem ser executados com bastante rigor e

cuidado de forma a assegurar a ocorrência do menor número possível de falsos resultados negativos. Esta questão é particularmente importante, visto que os resultados negativos em rastreio conduzem a que o processo de análise termine, não sendo efetuadas as consequentes análises de confirmação e quantificação (Barroso *et al.*, 2009; Janicka *et al.*, 2010).

Os imunoensaios baseiam-se em reações imunológicas que ocorrem entre antígenos e anticorpos. Consistem na utilização de um anticorpo, que apresenta afinidade estrutural para os analitos a pesquisar e um antígeno marcado que compete na reação com esses analitos. Deste modo é possível detetar a conjugação entre os analitos pesquisados e o anticorpo. Segundo o tipo de marcadores utilizados, os imunoensaios podem distinguir-se em imunoensaios por fluorescência polarizada, nos quais são utilizados fluorocromos (Feng *et al.*, 2007), enzimáticos, que utilizam enzimas (Tsanaclis & Wicks, 2008), e radioimunoensaios, que envolvem isótopos radioativos (Moody *et al.*, 2004), entre outros.

Outras técnicas utilizadas são os métodos cromatográficos, tais como a cromatografia gasosa e líquida, conjugados com diversos métodos de deteção, nomeadamente a espectrometria de massa.

3.8.3. Métodos de confirmação e quantificação

Para todos os resultados positivos obtidos através dos métodos de rastreio é necessário efetuarem-se técnicas mais específicas e rigorosas para identificar/confirmar e quantificar os analitos detetados na fase de rastreio.

De entre as técnicas de confirmação e quantificação existentes, destacam-se as cromatografias líquida e gasosa conjugadas com a espectrometria de massa (Barroso *et al.*, 2008; Jagerdeo *et al.*, 2008; Sergi *et al.*, 2009; Strano-Rossi *et al.*, 2008).

Estas técnicas requerem, em geral, uma fase de preparação das amostras. Os métodos de extração mais comuns em toxicologia forense são a extração líquido-líquido e a extração em fase sólida. A primeira baseia-se na separação dos analitos tendo por base as suas solubilidades, sendo que a extração ocorre entre duas fases líquidas imiscíveis (uma aquosa e outra orgânica) através da adição de solventes adequados (Gottardo *et al.*, 2008; Kala *et al.*, 2008; Saito *et al.*, 2007; Strano-Rossi *et al.*, 2008). No caso da análise da cocaína e seus metabolitos este método não é muito eficiente, visto que embora o isolamento da cocaína e a ecgonina metil éster seja fácil, a benzoilecgonina, por ser um analito anfotérico, torna a extração mais complexa requerendo um ajuste do pH. A utilização de elevados volumes de solventes orgânicos, a formação de emulsões, a fraca reprodutibilidade e a recuperação reduzida da cocaína e seus metabolitos são algumas desvantagens deste método (Ulrich, 2000). A extração em fase sólida (Figura 7) consiste na separação dos analitos de uma matriz biológica por absorção destes através de uma fase sólida porosa presente numa coluna de polipropileno ou vidro (Antonides *et al.*, 2007; Barroso *et al.*, 2008; Feng *et al.*, 2007; Pehrsson *et al.*, 2008; Yawney *et al.*, 2003). Os compostos são separados tendo por base a sua afinidade com a fase estacionária. A seleção do tipo de coluna de extração a utilizar depende das propriedades físicas e químicas dos analitos. No caso da análise de cocaína e seus metabolitos, as fases estacionárias

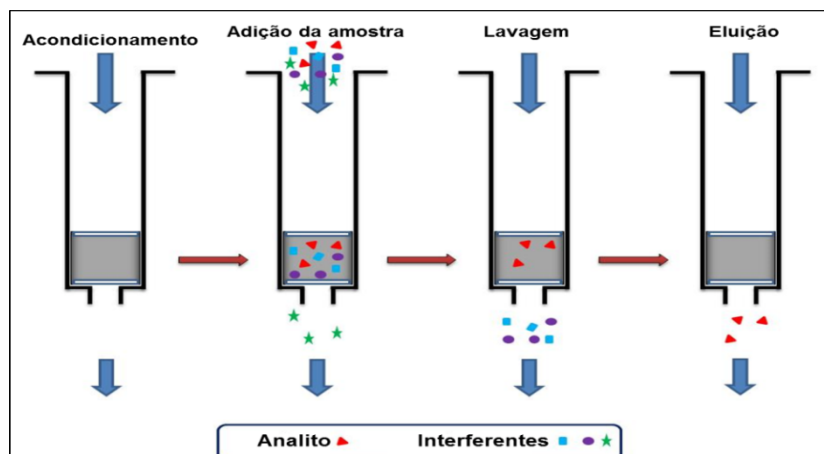


Figura 7 - Diagrama representativo da técnica de extração em fase sólida.⁶

mais usadas são as de fase reversa (apolares) em que a sílica está ligada a grupos octadecilsilano (C18) ou octilsilano (C8), de troca catiónica e de modo misto. A última consiste na combinação das duas anteriores e permite a extração de analitos polares e apolares na mesma coluna através de um mecanismo de retenção duplo (apolar e troca iónica). O modo misto tem sido descrito como a melhor escolha para a fase estacionária das colunas de extração na análise de cocaína e seus metabolitos porque garante elevadas recuperações, cromatogramas mais limpos e grande precisão (Jagerdeo & Abdel-Rehim, 2009).

No que se refere ao isolamento da cocaína e seus metabolitos do sangue, a preparação das amostras envolve, principalmente, quatro etapas.

Na primeira é realizada a diluição da amostra, momento durante o qual são adicionados os padrões internos, em geral compostos na forma trideuterada (cocaína-D3, benzoilecgonina-D3, ecgonina metil éster-D3), tendo como principal função mimetizar o comportamento do analito, controlando os erros que poderiam ocorrer

⁶ Adaptado de <http://www.intechopen.com/books/chromatography-the-most-versatile-method-of-chemical-analysis/current-trends-in-sample-treatment-techniques-for-environmental-and-food-analysis>.

durante a execução do método analítico devido às perdas de amostra, melhorando desta forma a precisão e exatidão.

Numa segunda fase é efetuada a extração dos analitos de interesse da matriz que tem como finalidade o isolamento e concentração dos analitos, a remoção dos compostos interferentes com os métodos instrumentais de análise e obtenção de extratos mais limpos de modo a aumentar a sensibilidade e seletividade.

Seguidamente os solventes da extração são evaporados sob uma corrente de azoto, permitindo ainda a concentração do analito e a sua redissolução num solvente adequado ao método instrumental de análise.

A derivatização é uma etapa fundamental quando é utilizada a cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa, consistindo numa reação através da qual os compostos adquirem novas propriedades relativamente à volatilidade, solubilidade e reatividade. Desta forma, observa-se melhoria na forma dos picos cromatográficos, aumento da eficiência de separação e da resolução, permitindo a deteção de concentrações mais baixas. A derivatização é ainda bastante útil para se conseguirem espectros de massa mais característicos de cada analito. Enquanto a cocaína e o cocaetileno são facilmente detetados sem derivatização, a maioria dos metabolitos da cocaína necessitam dessa etapa.

Os métodos de derivatização mais usados em toxicologia são a sililação, a alquililação e a acilação, sendo que os agentes de derivatização incluem os grupos silil, alquil e acil, respetivamente. Estes agentes derivatizantes têm como função

substituir o próton ativo dos grupos amina ($-NH$), tiol ($-SH$) e hidroxilo ($-OH$), originando derivados apolares e mais voláteis.

A sililação é a reação de derivatização mais frequentemente utilizada na confirmação e quantificação de cocaína e seus metabolitos por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa em diferentes matrizes biológicas. Os compostos químicos mais utilizados como agentes deste método de derivatização são o N-metil-N-trimetilsilil-trifluoroacetamida (MSTFA) e o N,O-bis-trimetilsilil-trifluoroacetamida (BSTFA) que, ao cederem o grupo trimetilsilil, proporcionam elevada estabilidade e volatilidade aos novos compostos. Muitas vezes é também utilizado um catalisador, como o trimetilclorosilano (TMCS), para que seja aumentada a eficiência dos agentes de derivatização (Barroso *et al.*, 2008; Brunet *et al.*, 2008; Merola *et al.*, 2010; Valente *et al.*, 2010).

3.8.3.1. Métodos cromatográficos acoplados à espectrometria de massa

A cromatografia é uma técnica de separação baseada na distribuição dos componentes de uma mistura entre um fluido (fase móvel) e um adsorvente (fase estacionária). As cromatografias líquida e gasosa conjugadas com a espectrometria de massa são os métodos mais utilizados na confirmação e quantificação da cocaína e seus metabolitos.

A cromatografia líquida executada em alta eficiência acoplada à espectrometria de massa, nomeadamente *em tandem*, permite limites de detecção muito baixos,

elevada seletividade e sensibilidade sem recurso à etapa de derivatização (Berg *et al.*, 2009; Bouzas *et al.*, 2009; Johansen & Bhatia, 2007; Mercolini *et al.*, 2008).

A cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa tem sido a técnica mais utilizada na análise de cocaína e seus metabolitos em várias amostras biológicas (Barroso *et al.*, 2008; Cardona *et al.*, 2006; Strano-Rossi *et al.*, 2008). No entanto, requer uma preparação da amostra mais complexa do que na cromatografia líquida e exige a etapa de derivatização dos analitos.

A espectrometria de massa além de possibilitar elevada sensibilidade e limites de detecção bastante reduzidos apresenta ainda a vantagem particular de permitir a utilização, como padrões internos, de análogos deuterados da cocaína e seus metabolitos, que, dado serem quimicamente idênticas aos analitos, permitem análises com elevada precisão e reprodutibilidade face a outros tipos de detetores, como o de azoto e fósforo (Isenschmid *et al.*, 2010; Valente *et al.*, 2012).

3.9. Estabilidade da cocaína nas amostras biológicas

Com a finalidade de se otimizar as diversas etapas da análise toxicológica, é reconhecida a importância do estudo de diversos fatores que influenciam a estabilidade da cocaína presente em amostras biológicas, sendo que as matrizes mais frequentemente utilizadas nestes estudos são o sangue, a urina e o plasma (Antonides *et al.*, 2007; Baselt *et al.*, 1983; Baselt & Chang, 1987; Isenschmid *et al.*, 1989; Klingman *et al.*, 2001; Rees *et al.*, 2012). A avaliação da estabilidade da cocaína em amostras alternativas como o cabelo, a saliva e o humor vítreo também é efetuada de

forma a estudar-se a correlação das concentrações dos metabolitos presentes nestas amostras com as detetadas no sangue (Antonides *et al.*, 2007; Duer *et al.*, 2006; Mackey-Bojack *et al.*, 2000; Romolo *et al.*, 2003).

A maioria dos estudos publicados avalia os fatores que estão mais relacionados com as etapas de colheita, armazenamento, transporte e preparação das amostras, nomeadamente a concentração inicial da substância, tempo e temperatura de conservação, pH das amostras e concentrações de conservantes utilizados (Antonides *et al.*, 2007; Baselt *et al.*, 1983; Baselt & Chang, 1987; Duer *et al.*, 2006; Isenschmid *et al.*, 1989; Kiszka *et al.*, 2001; Klingman *et al.*, 2001; Rees *et al.*, 2012; Romolo *et al.*, 2003; Skoop *et al.*, 2001).

3.9.1. Temperatura e tempo de armazenamento

A temperatura à qual são conservadas as amostras biológicas tem sido considerada como um dos principais fatores mais relevantes na estabilidade da cocaína. A hidrólise da cocaína, nomeadamente em benzoilecgonina e ecgonina metil éster, é favorecida pelo aumento de temperatura de conservação das amostras (Baselt, *et al.*, 1983; Isenschmid *et al.*, 1989; Hippenstiel & Gerson, 1994; Kiszka *et al.*, 2000; Kiszka *et al.*, 2001; Klingman, *et al.*, 2001; Levine *et al.*, 1996; Skoop *et al.*, 2001; Rees *et al.*, 2012).

Baselt *et al.* (1983) observaram que, ao fim de 21 dias, amostras de sangue mantidas a 25°C perderam 90% da concentração inicial de cocaína, valor três vezes superior ao verificado à temperatura de 4°C (30%).

Num estudo de longa duração, em amostras de sangue conservadas com 2% de fluoreto de sódio, a pH 5 e mantidas a temperaturas inferiores a 4°C, a concentração da cocaína permaneceu inalterada durante pelo menos 150 dias (Isenschmid *et al.*, 1989).

Kiszka *et al.* (2001) através da conservação das amostras à temperatura de -20°C conseguiram estabilizar a concentração de 5 µg/g de cocaína no sangue durante pelo menos 90 dias. Os mesmos resultados foram obtidos conjugando a conservação à temperatura de 4°C com a adição de ácido acético e fluoreto de sódio à amostra.

Mais recentemente, num estudo de 84 dias, Rees *et al.* (2012) testaram três temperaturas de conservação (temperatura ambiente, 4 e -18°C). Foi observado que a cocaína permaneceu estável apenas até ao 7º dia de estudo em amostras de sangue conservadas com pelo menos 1% de fluoreto de sódio e à temperatura de 4°C, enquanto a temperatura de conservação de -18°C permitiu que a concentração da cocaína nas amostras se mantivesse estável durante o tempo total do estudo.

Klingman *et al.* (2001) observaram que em amostras de plasma com 1000 ng/mL conservadas à temperatura de 4°C a degradação da cocaína foi menor do que nas amostras mantidas a 20°C num estudo efetuado durante 15 dias. Ao adicionarem 0,25% de fluoreto de potássio e conservando a uma temperatura de 4°C, a concentração do analito no final do estudo foi de aproximadamente 400 ng/mL, enquanto nas amostras mantidas à temperatura de 20°C ao 10º dia de estudo a cocaína já se tinha perdido totalmente.

A conservação de amostras de urina a baixas temperaturas também demonstrou ser essencial à estabilidade da cocaína. Em amostras mantidas à temperatura de -15°C e estabilizadas a pH 5 a concentração da cocaína permaneceu estável durante pelo menos 110 dias (Hippenstiel & Gerson, 1994).

3.9.2. Tipo e concentração de conservantes

De entre os conservantes mais utilizados em estudos de estabilidade da cocaína, destaca-se o fluoreto de sódio. Este sal é aplicado para inibir a pseudocolinesterase de forma a inviabilizar a hidrólise da cocaína por via enzimática e consequente formação de ecgonina metil éster.

Dependendo do tipo de amostra biológica utilizada, a ação do fluoreto de sódio na prevenção da degradação da cocaína pode ser diferente. Baselt *et al.* (1983) relataram que este conservante é mais influente nas amostras de sangue do que nas de urina, os mesmos resultados foram observados por Kiszka *et al.* (2000). Isto pode dever-se ao facto da urina não possuir esterases, sendo o pH o fator que mais afeta a estabilidade da cocaína nesta matriz biológica (Baselt *et al.*, 1983).

Em amostras de sangue mantidas a 4°C com 0,5% de fluoreto de sódio, observou-se que até ao 21º dia de estudo apenas 20% da cocaína presente inicialmente foi hidrolisada (Baselt *et al.*, 1983), contrastando com os resultados obtidos por Isenschmid *et al.* (1989) que verificaram 50% de perda da cocaína em amostras refrigeradas à mesma temperatura e durante o mesmo intervalo de tempo, não tendo sido preservadas com fluoreto de sódio.

Num estudo de curta duração (até 48h), Brogan *et al.* (1992) testaram diversas percentagens de fluoreto de sódio em amostras de sangue fortificadas com cocaína (900 ng/mL) mantidas à temperatura ambiente e a 4°C. Verificaram que 0,25; 0,5 e 1% de fluoreto de sódio adicionado às amostras mantidas a ambas as temperaturas estudadas inibem a degradação da cocaína, tendo sido detetado ao final do estudo 86, 86 e 89% da cocaína presente inicialmente. Estes valores contrastaram em muito com o valor de 23% observado nas amostras que foram conservadas sem conservante. Os autores concluíram, portanto, que estas percentagens de fluoreto de sódio são suficientes para estabilizar a cocaína em amostras de sangue durante o transporte e a conservação de curto prazo, independentemente da temperatura de conservação.

Rees *et al.* (2012) verificaram que em amostras de sangue com 0,4 mg/L de cocaína, ao final de 84 dias, a perda de cocaína em amostras preservadas com 2% de fluoreto de sódio foi mais baixa do que com 1%. Foi detetada, respetivamente, 98 e 88% de perda da cocaína presente inicialmente. Estes resultados contrastam com a degradação total observada nas amostras conservadas sem este sal logo ao 7º dia de estudo.

Baselt *et al.* (1993) testaram várias conjugações de conservantes em amostras de 10 mL de sangue com cocaína (200 ng/mL) mantidas à temperatura de 4°C durante 1 ano: 100 mg de fluoreto de sódio e 20 mg de oxalato de potássio; 100 mg de fluoreto de sódio e 20 mg de ácido oxálico; 100 mg de fluoreto de sódio, 20 mg de ácido oxálico e 10 mg de ecotiofato (iodeto de dietoxifosfiniltiocolina). Em termos de percentagem

de perda de cocaína, no final do estudo os resultados obtidos foram 100, 76 e 60%, respectivamente.

Klingman *et al.* (2001) e Skoop *et al.* (2001) analisaram amostras de plasma conservadas com fluoreto de potássio. Os resultados evidenciaram que a hidrólise de cocaína foi inferior nas amostras com 0,25% de fluoreto de potássio face à sua ausência. Klingman *et al.* (2001) verificaram que em amostras preservadas com 0,25% de fluoreto de potássio e à temperatura de 4°C a cocaína permaneceu estável até ao 14º dia.

3.9.3. pH das amostras

O pH das amostras biológicas também se tem mostrado como um fator que afeta bastante a estabilidade da cocaína em amostras biológicas. Tal como ocorre com a temperatura, o aumento do pH contribui para a degradação deste analito (Baselt *et al.*, 1983; Isenschmid *et al.*, 1989; Kiszka *et al.*, 2000). Porém, os estudos de estabilidade da cocaína que avaliaram este fator são efetuados maioritariamente em amostras de urina, matriz biológica mais suscetível a este fator.

Baselt *et al.* (1983), num estudo de duração de 21 dias, demonstraram que em amostras de urina mantidas à temperatura de 4°C e sujeitas a dois valores de pH (5 e 8), a concentração de cocaína permaneceu constante durante o tempo total do estudo nas amostras estabilizadas a pH 5.

Num estudo de maior duração (90 dias), no qual foi avaliado o efeito de diferentes valores de pH 5, 6 e 8 em amostras de urina mantidas a -20°C, o pH 5

permitiu a estabilidade da cocaína durante o tempo total do estudo (Kiszka *et al.*, 2000).

Também os resultados obtidos por Moody *et al.* (1999) convergem para a conclusão de que um ajuste para valores de pH ácido nas amostras de urina é essencial para prevenir a degradação da cocaína. Neste trabalho verificou-se que em amostras conservadas à temperatura de -20°C e a pH 6 se perdeu 15% da cocaína apenas aos 165 dias de estudo.

Isenschmid *et al.* (1989) efetuaram um estudo de longa duração em amostras de sangue, no qual foram comparadas três tipos de amostras: sangue não preservado com fluoreto de sódio e pH fisiológico; sangue conservado com 2% de fluoreto de sódio e pH fisiológico e sangue conservado com 2% de fluoreto de sódio e pH 5. Todas as amostras foram mantidas a 4 e 25°C. Apenas nas amostras conservadas à temperatura de 4°C, com 2% de fluoreto de sódio e pH 5 a concentração de cocaína permaneceu estável durante pelo menos 150 dias.

No trabalho referido anteriormente também foi comparada a estabilidade da cocaína em amostras de sangue *post mortem* sem conservantes e em amostras de sangue *in vivo*. Os resultados demonstraram que a cocaína foi mais estável nas amostras de sangue *post mortem*. Este facto foi explicado pelas diferenças de valor de pH dos dois tipos de sangue, sendo que o sangue *post mortem* apresenta um valor de pH mais baixo, aproximadamente 6,8, contrastando com o pH 7,4 das amostras de sangue *in vivo*. A redução do pH no sangue *post mortem* ocorre essencialmente devido aos processos de decomposição que decorrem após a morte (Isenschmid *et*

al., 1989). Os resultados de Moriya & Hashimoto (1996) também convergiram neste sentido, tendo sido observado que em amostras de sangue *post mortem* as concentrações da cocaína se mantiveram inalteradas durante pelo menos 24h.

Com a finalidade de acidificar as amostras biológicas para prevenir a hidrólise da cocaína, já foram identificados diversos compostos. Segundo os resultados de Baselt & Chang (1987), o ácido ascórbico revelou-se muito importante na obtenção do meio ácido em amostras de urina. Este composto preveniu essencialmente a conversão da cocaína em benzoilecgonina. Neste caso, foi utilizada a concentração de 3,33 mg/mL de ácido ascórbico.

Isenschmid *et al* (1989) e Kiszka *et al.* (2001) estabilizaram as amostras de sangue conservadas com fluoreto de sódio (2%) a pH 5, através da adição de 10% v/v de ácido acético.

3.9.4. Concentração inicial de cocaína

A concentração inicial presente nas amostras apresenta-se como um fator pouco determinante na estabilidade da cocaína nas amostras biológicas. *In vitro* a hidrólise da cocaína é independente da sua concentração inicial.

Isenschmid *et al.* (1989) testaram duas concentrações iniciais de cocaína (0,25 e 1 mg/L) em amostras de sangue *post mortem* e *in vivo* conservadas a duas temperaturas diferentes (4 e 25°C) durante 72h. Não foram notadas diferenças relativamente à degradação do analito tendo em conta as concentrações que se apresentavam inicialmente.

3.9.5. Ciclos de congelação/descongelação

Um dos tipos de estabilidade normalmente avaliado está relacionado com a estabilidade dos analitos durante ciclos de congelação/descongelação. Estes ciclos têm como objetivo simular a rotina dos laboratórios de toxicologia forense, durante a qual as amostras podem ser congeladas e descongeladas diversas vezes, devido à necessidade de se efetuarem diferentes tipos de análises (Peters, 2007).

Segundo Peters (2007) este tipo de estabilidade da cocaína é avaliado normalmente após a execução de pelo menos três ciclos. Cada ciclo consiste, regra geral, numa etapa de congelação durante vinte e quatro horas seguida de outra de descongelação até à temperatura ambiente.

Tendo em conta estes pressupostos, a cocaína tem-se mostrado bastante estável durante 3 ciclos de congelação e descongelação em diversos tipos de matrizes biológicas, tal como o sangue, a urina, o plasma, o suor e saliva (Concheiro *et al.*, 2010; Concheiro *et al.*, 2011; Dams *et al.* 2003; Lin *et al.*, 2001; Xiong *et al.*, 2013).

VI. OBJETIVOS DO TRABALHO

A cocaína é uma das substâncias ilícitas mais consumida atualmente e, por isso, revela-se particularmente importante a otimização da sua análise, visto que a sua presença e concentração poderão ser determinantes na avaliação da causa de morte ou da circunstância do acidente, nomeadamente no âmbito da fiscalização da condução sob o efeito de substâncias psicoativas.

O facto de esta substância estar sujeita a diversos mecanismos de hidrólise pode conduzir a que os resultados das análises toxicológicas não espelhem a situação existente no momento da colheita das amostras.

Este trabalho debruçou-se essencialmente sobre a estabilidade da cocaína durante a fase pré-analítica de amostras de sangue *post mortem* e *in vivo*, nomeadamente na conservação, armazenamento e preparação das mesmas, de forma determinar-se quais as melhores condições de conservação de amostras de sangue de forma a minimizar a degradação de cocaína.

Tendo em consideração os fatores que mais afetam a estabilidade da cocaína em amostras de sangue, foram definidos os seguintes objetivos para este trabalho:

- 1) Estudar a influência do tempo de armazenamento na estabilidade da cocaína em amostras de sangue *post mortem* e *in vivo*;

- 2) Avaliar o efeito da temperatura de conservação das amostras de sangue *post mortem* e *in vivo* na degradação da cocaína;
- 3) Avaliar se a concentração inicial de cocaína presente nas amostras influencia a estabilidade desta em amostras de sangue *post mortem* e *in vivo*;
- 4) Estudar o efeito da adição do fluoreto de sódio como conservante da cocaína em amostras de sangue *post mortem* e *in vivo*;
- 5) Determinar a influência do ácido ascórbico na estabilidade da cocaína em amostras de sangue *post mortem* e *in vivo*;
- 6) Avaliar o efeito do pH das amostras de sangue *post mortem* e *in vivo* na estabilidade da cocaína;
- 7) Avaliar a estabilidade da cocaína durante ciclos de congelação/descongelação em amostras de sangue *post mortem* e *in vivo*;
- 8) Estudar a estabilidade da cocaína em extratos derivatizados.

VII. MATERIAL E MÉTODOS

1. Padrões e Reagentes

O padrão de referência da cocaína, o seu homólogo deuterado (cocaína-D3), a benzoilecgonina, a benzoilecgonina deuterada (benzoilecgonina-D3) e a ecgonina metil éster foram adquiridos à *Cerilliant* (EUA), enquanto a ecgonina metil éster na sua forma deuterada (ecgonina metil éster-D3) foi fornecido pela *Lipomed* (Suíça). Todos os padrões estavam na forma livre com exceção da ecgonina metil éster-D3 que se apresentava na forma de cloridrato. Todos os padrões de referência encontravam-se dissolvidos em metanol, à exceção da cocaína e da cocaína-D3 que se estavam dissolvidos em acetonitrilo.

O fluoreto de sódio, o acetato de etilo, o ácido clorídrico a 25%, a amónia a 25%, o diclorometano, o dihidrogenofosfato de potássio, o n-hexano, o metanol e o 2-propanol foram adquiridos à *Merck* (Alemanha).

O acetonitrilo foi adquirido à *Fluka* (EUA), enquanto o ácido ascórbico foi gentilmente cedido pelo departamento de Bromatologia da Faculdade de Farmácia, da Universidade de Lisboa.

Os reagentes de derivatização MSTFA e TMCS foram adquiridos à *Macherey-Nagel* (Alemanha).

A água desionizada utilizada durante este trabalho foi produzida num sistema de purificação de água *Simplicity* 185 da *Millipore* (EUA).

2. Soluções

- **Solução padrão da cocaína a 10 µg/mL (10 mL):** a um balão volumétrico de 10 mL foi adicionado o volume de 100 µL de cocaína a 1 mg/mL e fez-se o volume total com acetonitrilo. A solução foi homogeneizada por inversão.
- **Solução padrão da cocaína a 1 µg/mL (10 mL):** a um balão volumétrico de 10 mL foi adicionado 1 mL de solução padrão da cocaína a 10 µg/mL e fez-se o volume total com acetonitrilo. A solução foi homogeneizada por inversão.
- **Solução da mistura padrão interno de cocaína e seus metabolitos deuterados a 10 µg/mL (10 mL):** num balão volumétrico de 10 mL adicionaram-se 100 µL de cocaína-D3, de benzoilecgonina-D3 e de ecgonina metil ester-D3 a 1mg/mL e fez-se o volume total com acetonitrilo. A solução foi homogeneizada por inversão.
- **Solução da mistura padrão da cocaína e seus metabolitos a 10 µg/mL (10 mL):** num balão volumétrico de 10 mL adicionaram-se 100 µL de cocaína, de benzoilecgonina e de ecgonina metil éster a 1 mg/mL e fez-se o volume total com acetonitrilo. A solução foi homogeneizada por inversão.
- **Solução da mistura padrão da cocaína e seus metabolitos a 1 µg/mL (10 mL):** num balão volumétrico de 10 mL colocou-se 1 mL de solução mistura padrão da cocaína e seus metabolitos a 10 µg/mL e fez-se o volume total com acetonitrilo. A solução foi homogeneizada por inversão.

- **Solução de dihidrogenofosfato de potássio a 0,1 M (1000 mL)**: Pesaram-se 13,61 g de dihidrogenofosfato de potássio e transferiu-se para um balão volumétrico de 1000 mL. Perfez-se o volume total com água desionizada e homogeneizou-se até à dissolução completa do dihidrogenofosfato de potássio.
- **Solução de ácido clorídrico a 5 M (100 mL)**: a um balão volumétrico de 100 mL contendo 30 mL de água desionizada adicionaram-se 64,3 mL de HCl a 25%. Perfez-se o volume total com água desionizada e homogeneizou-se por inversão.
- **Solução de ácido clorídrico a 0,1 M (250 mL)**: num balão volumétrico de 250 mL contendo 100 mL de água desionizada adicionaram-se 5 mL de HCl a 5 M. Perfez-se o volume total com água desionizada e homogeneizou-se por inversão.
- **Solução de diclorometano/metanol (70:30, v/v) (100 mL)**: num balão volumétrico de 100 mL adicionaram-se 70 mL de diclorometano a 30 mL de metanol. A solução foi homogeneizada por inversão.
- **Solução de diclorometano/2-propanol/amónia (78:20:2, v/v/v) (100 mL)**: num balão volumétrico de 100 mL adicionaram-se 78 mL de diclorometano e 20 mL de 2-propanol e homogeneizou-se por inversão. A esta solução foram adicionados 2 mL de amónia que foi homogeneizada por inversão.
- **Solução de derivatizante MSTFA/TMCS (95:5, v/v) (20 mL)**: num balão volumétrico de 20 mL adicionaram-se 19 mL de MSTFA e 1 mL de TMCS. A solução foi homogeneizada por inversão.

Todas as soluções foram conservadas entre 2 e 8°C, e mantidas ao abrigo da luz.

3. Equipamentos

- Balança analítica modelo 770-13 (*Kern & Sohn GmbH*, Alemanha);
- Banho seco para derivatização, modelo QBT2 (*GRANT*, Reino Unido);
- Homogeneizador de inversão rotação, modelo SRT2 (*Stuart Scientific*, Reino Unido);
- Evaporador com corrente de azoto, modelo TurboVap LV (*Capiler Life Sciences*, EUA);
- Câmara para extração em fase sólida manual com capacidade para 20 colunas, modelo Vac Master (*International Sorbent Technology Ltd*, Reino Unido) associada a uma bomba de vácuo, modelo DOA-P504-13N (*GAST Manufacturing*, EUA);
- Centrifuga, modelo Megafuge 1.0 (*Heraeus Sepatech GmbH*, Alemanha);
- Cromatógrafo de gases modelo 6890N, acoplado a um detetor seletivo de massa modelo 5973 e dotado de um injetor automático modelo 7683 (*Agilent*, EUA);
- Encapsulador (*Agilent*, EUA);
- Vortex, modelo ZX3 (*Velp Scientifica srl*, Itália);
- Potenciômetro (*Metrohm*, Suíça).

4. Materiais

- Pipetas automáticas (*Eppendorf*, Alemanha);
- Dispensador (*Eppendorf*, Alemanha);

- Colunas de extração em fase sólida *Oasis® MCX* de 60 mg de enchimento e 3 mL volume (*Waters Corporation*, EUA);
- *Vials* de 300 µL (*Chromacol*, Reino Unido);
- Tampas de alumínio com septos de 11 mm de diâmetro (*Chromacol*, Reino Unido);
- *Liners* de 4 mm de diâmetro interno para *split* com lã de vidro (*Agilent*, EUA);
- *O-rings* para *liners* (*Agilent*, EUA);
- Septos de 11 mm de diâmetro (*Agilent*, EUA);
- Seringa de 10 µL para o injetor (*Agilent*, EUA);
- Coluna cromatográfica, modelo HP-5MS com 30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro e 0,25 µm de espessura do filme (*Agilent*, EUA).

5. Amostras biológicas estudadas

As amostras de sangue utilizadas neste trabalho como amostras brancas foram colhidas *in vivo* ou *post mortem*, respetivamente no âmbito da fiscalização dos condutores sob influência de substâncias psicotrópicas e em autópsias médico-legais efetuadas no Serviço de Patologia Forense da Delegação Sul do Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses, I.P. ou nos Gabinetes Médico-Legais que atuam na sua dependência. Importa ainda referir, que a utilização de amostras de sangue colhidas no âmbito das atividades periciais do Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses, I.P. para fins de investigação científica, encontra-se previsto no artigo 31º da Deliberação nº 849/2010, de 07 de Maio (Regulamento Interno do INMLCF, IP), pelo que não suscita questões de natureza ética ou legal.

Foram formadas *pools* de amostras brancas para cada um dos tipos de sangue e realizada uma análise de confirmação para a cocaína e seus metabolitos, de forma a verificar a ausência destes compostos eventualmente presentes nas amostras em concentrações residuais. O resultado da confirmação foi negativo em todas as *pools*.

6. Estudos de estabilidade da cocaína

Ao longo deste trabalho foram realizados diversos tipos de estudos de estabilidade da cocaína no sangue.

Com o objetivo de estudar a estabilidade da cocaína no sangue após a colheita das amostras, foi elaborado um estudo onde foram avaliados alguns fatores que afetam a degradação desta substância, tais como a concentração inicial do analito, o tempo e temperatura de conservação da amostra e a adição de fluoreto de sódio utilizado como conservante.

Numa segunda fase, procedeu-se à avaliação da estabilidade da cocaína em amostras conservadas com ácido ascórbico. Neste caso, também foram analisadas amostras sujeitas a diferentes condições no que respeita ao tempo de armazenamento e temperatura de conservação.

A estabilidade da cocaína foi ainda avaliada em amostras sujeitas a três ciclos de congelação/descongelação e em extratos derivatizados.

6.1. Estudo do efeito da concentração inicial de cocaína, do conservante, temperatura e tempo de armazenamento na estabilidade da cocaína

De forma a avaliar-se o efeito da concentração inicial da cocaína presente nas amostras biológicas na estabilidade desta, fortificaram-se 250 mL de ambos os tipos de sangue (sangue *post mortem* e sangue *in vivo*) com 25 µL e 250 µL de solução de cocaína a 1 mg/mL de modo a obter-se as concentrações finais de 100 ng/mL e 1000 ng/mL, respetivamente.

A ação do fluoreto de sódio na estabilidade da cocaína nos dois tipos de sangue também foi avaliada. Para o efeito, cada *pool* de sangue⁷ foi dividida por oito recipientes de 30 mL de capacidade e em quatro desses foi adicionado 0,6 g de fluoreto de sódio, de forma a obter-se uma concentração de 0,02 g/mL de conservante.

Para avaliar a influência da temperatura de conservação na estabilidade da cocaína, todas as *pools* foram divididas em alíquotas de 3 mL, para que fossem evitados possíveis erros originados pelos consecutivos ciclos de congelação/descongelação. O número total de alíquotas obtidas foi então dividido por três temperaturas distintas: temperatura ambiente (do laboratório), de refrigeração (entre 2 e 8°C) e de congelação (-10°C).

Todas as amostras foram mantidas ao abrigo da luz.

⁷ No caso do sangue *post mortem* a concentração de fluoreto de sódio de referência não é 0 g/mL, visto que nestes casos as amostras originárias da *pool* já continham entre 0,5 e 1% de fluoreto de sódio. Desta forma, foi avaliado o efeito do conservante adicionado à concentração inicial.

O tempo de armazenamento foi outro fator avaliado, sendo que foram realizadas análises nos seguintes dias: 0 (aproximadamente 1h após fortificação), 1, 7, 14, 21, 28, 42, 64 e 93 (Figura 8). As alíquotas foram analisadas em duplicado.

De forma a determinar o valor de pH de cada uma das amostras testadas neste estudo (sangue *post mortem* e sangue *in vivo*), procedeu-se à medição deste parâmetro, com auxílio do potenciômetro.

6.2. Estudo do efeito do ácido ascórbico, temperatura e tempo de armazenamento na estabilidade da cocaína

De modo a determinar-se a influência do ácido ascórbico, temperatura e tempo de armazenamento na estabilidade da cocaína, fortificaram-se 250 mL da *pool* de cada tipo de sangue (*post mortem* e *in vivo*) com 250 µL de solução de cocaína a 1 mg/mL, tendo-se obtido a concentração final de 1000 ng/mL. Para que os ciclos de congelação e descongelação não afetassem a concentração final obtida após a análise, os 250 mL de ambos os tipos de sangue com cocaína a 1000 ng/mL foram divididos em alíquotas de 4 mL às quais foram adicionados 0,08 g de fluoreto de sódio. Sendo assim, foram obtidas alíquotas com 0,02 g/mL de fluoreto de sódio⁸.

⁸ No caso do sangue *post mortem* a concentração de fluoreto de sódio de referência não é 0 g/mL, visto que nestes casos as amostras originárias da *pool* já continham entre 0,5 e 1% de fluoreto de sódio. Desta forma, foi avaliado o efeito do conservante adicionado à concentração inicial.

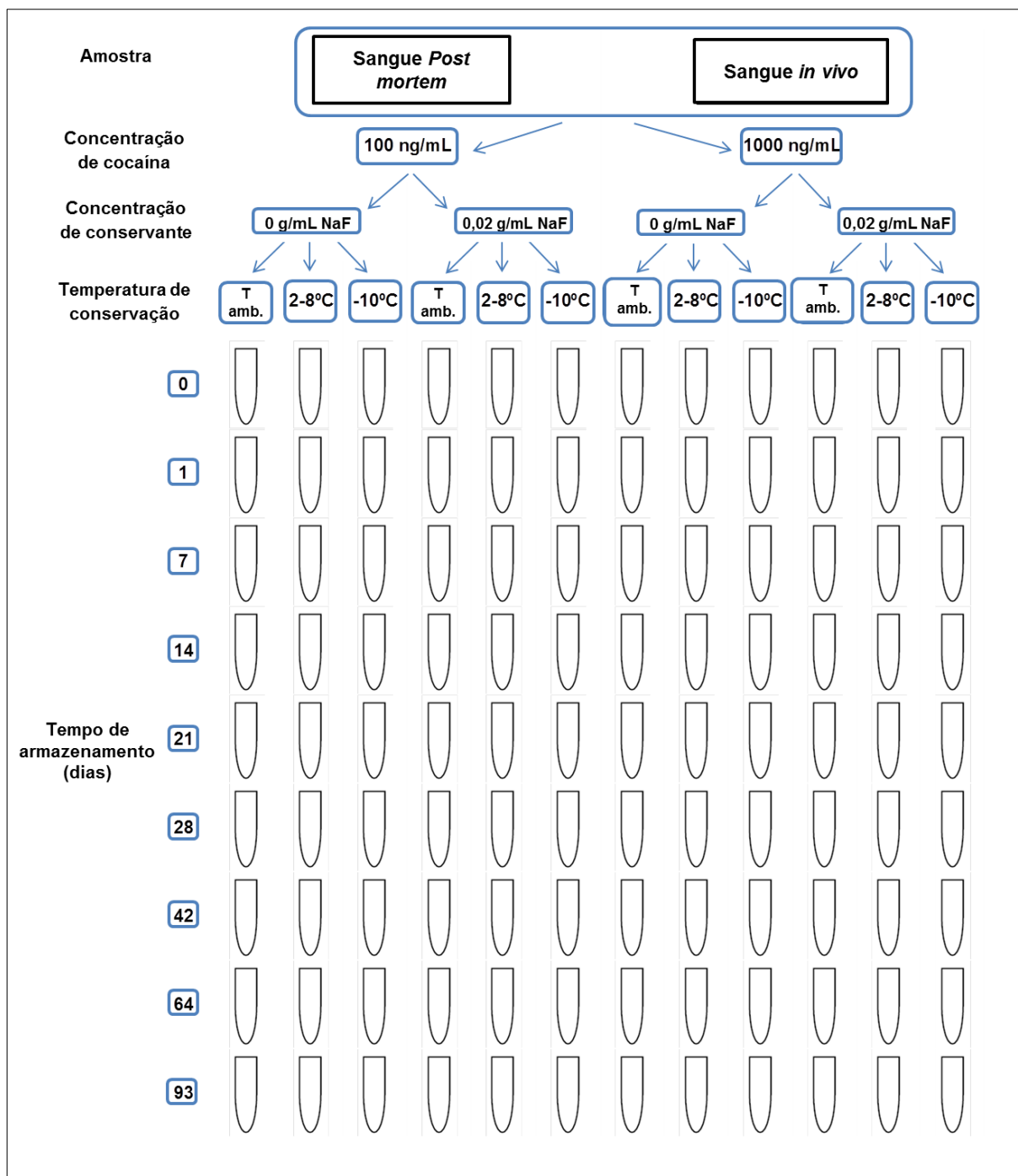


Figura 8 - Diagrama representativo do estudo do efeito da concentração inicial de cocaína, concentração de conservante, temperatura e tempo de armazenamento na estabilidade da cocaína.

Para que fosse avaliado o efeito do ácido ascórbico na estabilidade da cocaína, a metade das alíquotas de cada *pool* de sangue foram adicionados 0,012 g de ácido ascórbico, de forma a obter-se uma concentração final de 3 mg/mL.

Todas as alíquotas foram mantidas ao abrigo da luz e sujeitas a três temperaturas diferentes: temperatura ambiente (do laboratório), de refrigeração (2 a 8°C) e de congelação (-10°C).

O tempo de armazenamento também foi avaliado, sendo que foram realizadas análises nos seguintes dias: 0 (aproximadamente 1h após fortificação), 1, 7, 14, 21, 28, 42, 64 e 93 (Figura 9). As alíquotas foram analisadas em duplicado.

De forma a determinar o valor pH de cada uma das amostras testadas neste estudo (sangue *post mortem* com ácido ascórbico, sangue *post mortem* sem ácido ascórbico, sangue *in vivo* com ácido ascórbico e sangue *in vivo* sem ácido ascórbico), procedeu-se à medição deste parâmetro, com auxílio do potenciômetro.

6.3. Estudo da estabilidade de cocaína após ciclos de congelação/descongelação

Neste estudo foi avaliado o efeito dos ciclos de congelação/descongelação na estabilidade da cocaína, que normalmente ocorrem durante a rotina laboratorial do Serviço de Química e Toxicologia Forense devido à reanálise das amostras.

Tal como no estudo anterior, foram analisadas alíquotas com concentração de 1000 ng/mL de cocaína e 0,02 g/mL de fluoreto de sódio.

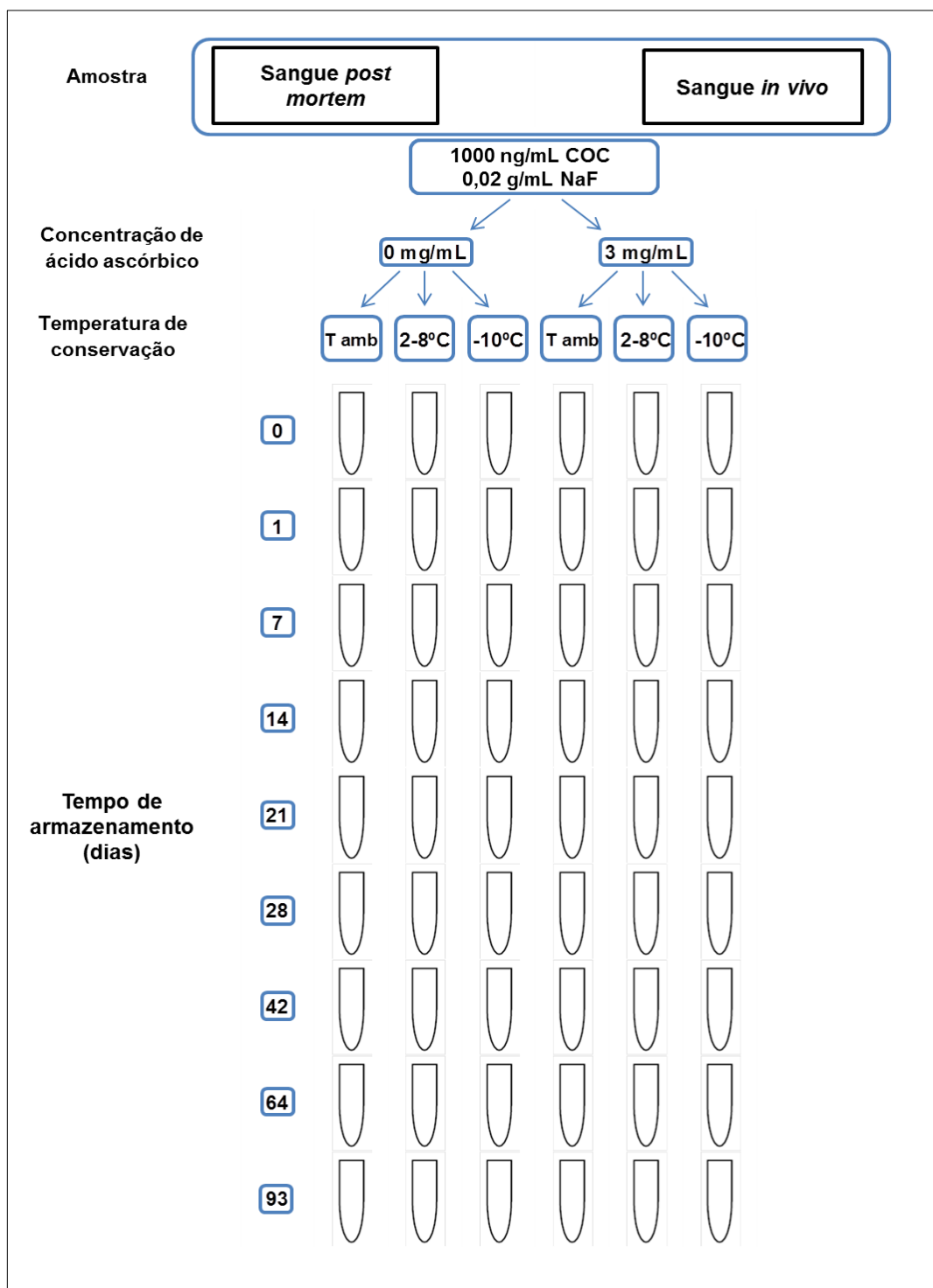


Figura 9 - Diagrama representativo do estudo do efeito do ácido ascórbico, temperatura e tempo de armazenamento na estabilidade de cocaína.

Todas as alíquotas foram mantidas à temperatura de -10°C e ao abrigo da luz.

Cada ciclo integrou 24 horas de congelamento à temperatura de -10°C seguidas de 4 horas de descongelamento à temperatura ambiente, através de movimentos de rotação e inversão. Embora tenham sido realizados três ciclos de congelamento/descongelamento, as alíquotas apenas foram sujeitas à extração em fase sólida e posterior análise após o primeiro e terceiro ciclos (Figura 10). As alíquotas foram analisadas em triplicado.

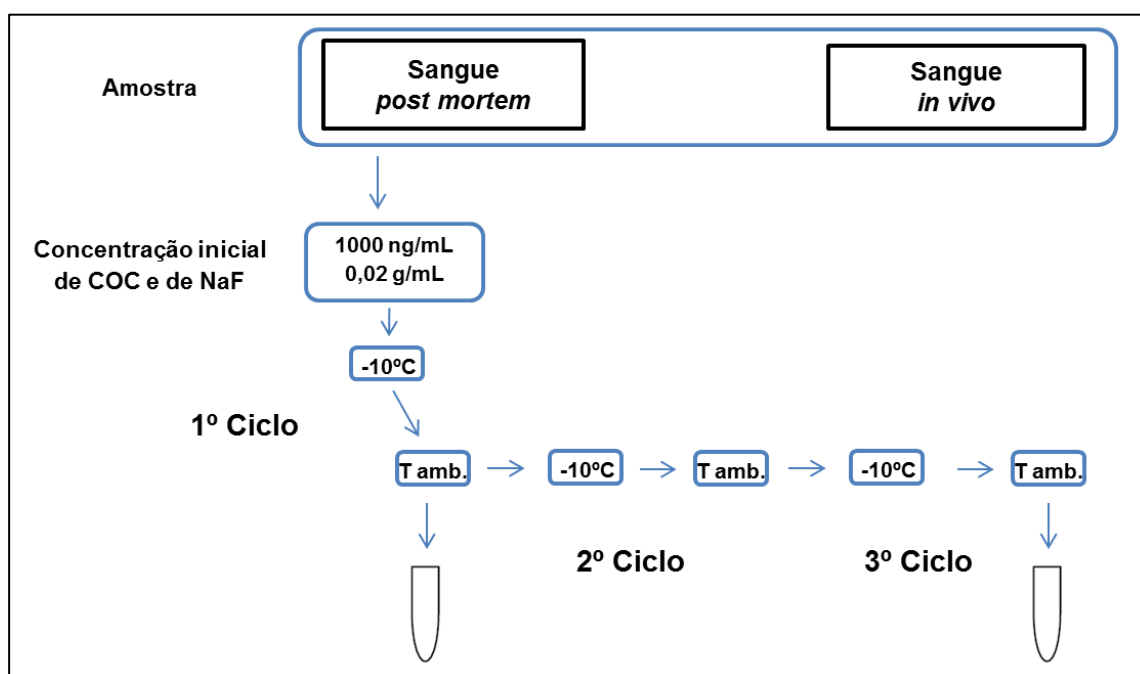


Figura 10 - Diagrama representativo do estudo da estabilidade de cocaína após ciclos de congelamento/ descongelamento.

6.4. Estudo da estabilidade de cocaína em extratos derivatizados

Para que fosse avaliada a estabilidade da concentração de cocaína nos extratos após derivatização estes foram reinjetados no equipamento cromatográfico 48h e 8 dias após a primeira injeção. Tal como no estudo anterior, foram analisadas

alíquotas com concentração de 1000 ng/mL de cocaína e 0,02 g/mL de fluoreto de sódio. As alíquotas foram analisadas em duplicado.

As percentagens de cocaína, benzoilecgonina e ecgonina metil éster foram obtidas tomando como valor de referência (100%) a concentração da cocaína quantificada no dia em que se procedeu à fortificação de cada *pool*.

6.5. Análise estatística

Nos estudos de estabilidade durante ciclos de congelação/descongelação a média das concentrações de cocaína obtidas em cada tratamento de cada estudo (1º ciclo vs 3º ciclo) foram submetidos ao teste T-*Student* onde se avaliou a igualdade das médias (hipótese nula - H0).

No estudo da estabilidade da cocaína em extratos derivatizados procedeu-se à análise de variância (ANOVA) para se efetuar a comparação das médias obtidas em cada dia após a derivatização (0h, 48h e 8d).

Para todos os testes estatísticos, o nível de significância foi de 5% ($\alpha = 0,05$).

7. Métodos analíticos

7.1. Preparação das amostras biológicas

As alíquotas de sangue após descongelação foram homogeneizadas por movimentos de rotação e inversão até atingirem a temperatura ambiente.

A alíquotas de 0,5 mL de sangue foram adicionados 25 µL de solução mistura padrão interno de cocaína-D3 e seus metabolitos deuterados (benzoilecgonina-D3 e ecgonina metil éster-D3) a 10 µg/mL. De seguida, procedeu-se à diluição das alíquotas em 8 mL da solução de dihidrogenofosfato de potássio a 0,1 M.

As alíquotas diluídas foram homogeneizadas, sendo sujeitas a movimentos de rotação e inversão durante cerca de 10 min. Posteriormente foram centrifugadas a 3500 rpm durante 15 min.

7.1.1. Extração em fase sólida

A extração da cocaína e dos seus metabolitos por extração em fase sólida foi realizada através de colunas Oasis® MCX, cujo mecanismo extrativo é de modo misto (fase reversa e troca catiónica).

Após o acondicionamento das colunas com 2 mL de metanol e 2 mL de água desionizada, o sobrenadante obtido na centrifugação das amostras diluídas foi introduzido na coluna de extração. Seguiu-se uma fase de lavagem das colunas utilizando água desionizada (2 mL) e ácido clorídrico (HCl) a 0,1 N (2 mL). Seguiram-se lavagens com diclorometano/metanol (70:30) (3mL) e n-hexano (3 mL).

A etapa seguinte consistiu na secagem das colunas de extração sob vácuo durante 10 min. Por último procedeu-se à eluição dos analitos com 2 mL de diclorometano/2-propanol/amónia (78:20:2).

7.1.2. Evaporação dos extratos

Os eluatos obtidos na fase anterior foram evaporados até à secura sob uma corrente de azoto à temperatura de 45°C durante 15 min.

7.1.3. Derivatização

A fase de derivatização química consistiu na solubilização do resíduo seco proveniente da evaporação com 65 µL da solução de derivatização MSTFA/TMCS (95:5). Esta solução foi agitada no *vortex* durante cerca de 15 s e aquecida a 80°C, durante 30 min. Após arrefecimento até à temperatura ambiente, a solução de derivatização foi transferida para *vials* que foram devidamente selados.

7.2. Análise por cromatografia gasosa e espectrometria de massa

Para a realização da separação cromatográfica foi utilizada uma coluna capilar de sílica fundida HP-5MS com 30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 µm de espessura do filme.

As condições cromatográficas foram: temperatura inicial do forno de 90°C durante 2 min, tendo-se seguido um gradiente térmico de 20°/min até aos 300°C, temperatura a qual foi mantida constante durante 3 min. O injetor e o detetor foram respetivamente programados para as temperaturas de 220 e 280°C. O volume de injeção foi de 2 µL e as injeções foram efetuadas em modo *split* numa proporção de 1:5.

Como gás de arraste foi utilizado o hélio (pureza superior a 99,9996%) com um fluxo constante de 0,8 mL/min.

A análise dos compostos pelo espectrómetro de massa foi realizada por ionização por eletrões, como uma corrente de filamento de 300 µA e uma energia de ionização de 70 eV. A confirmação e quantificação foram efetuadas no modo de

monitorização seletiva de íões, tendo sido monitorizados para cada analito três fragmentos iónicos considerando o tempo de retenção (Tr) do analito. Para a cocaína, os fragmentos iónicos monitorizados foram m/z 82, 182 e 303. No caso da benzoilecgonina analisaram-se os fragmentos iónicos m/z 82, 240 e 361 e para a ecgonina metil éster foram os íões m/z 82, 96 e 271 (os fragmentos iónicos sublinhados foram os utilizados para a quantificação). Para os padrões internos, foram monitorizados os fragmentos iónicos m/z 185, 243 e 85 para a cocaína-d3, benzoilecgonina-d3 e ecgonina metil éster-d3, respetivamente.

A cada 100 análises, os *liners* utilizados foram trocados de forma a prevenir a diminuição da sensibilidade.

A aquisição e tratamentos dos dados foram obtidos com os programas informáticos *Enhanced ChemStation* G1701CA, versão C.00.00 de 31 de Dezembro de 1999, e *MSD ChemStation* G1701DA, versão D.01.00 Build 75, de 26 de Agosto de 2003 (*Agilent*, EUA).

7.3. Preparação das curvas de calibração utilizadas na quantificação da cocaína, benzoilecgonina e ecgonina metil éster

A concentração da cocaína e seus metabolitos nas amostras em estudo foi estabelecida através de curvas de calibração, uma por composto, com seis pontos de calibração obtidos por fortificação de amostras brancas, de acordo com a tabela 2.

Tabela 2 - Concentrações da curva de calibração necessária para quantificação da cocaína e seus metabolitos.

Calibrador	Soluções de ref. ⁹ 1 µg/mL	Soluções de ref. ⁹ 10 µg/mL	Solução Pi ¹⁰ 10 µg/mL
1 (25 ng/mL)	12,5 µL	-	25 µL
2 (200 ng/mL)	100 µL	-	25 µL
3 (400 ng/mL)	-	20 µL	25 µL
4 (600 ng/mL)	-	30 µL	25 µL
5 (800 ng/mL)	-	40 µL	25 µL
6 (1000 ng/mL)	-	50 µL	25 µL

7.4. Preparação das amostras do controlo de qualidade interno

As amostras objecto dos estudos de estabilidade e as amostras da curva de calibração foram preparadas simultaneamente com as amostras do controlo de qualidade interno em cada dia de estudo.

Sendo assim, foram preparadas amostras de controlo positivas, de forma a avaliar-se simultaneamente a exatidão e precisão. Estes controlos foram preparados de forma independente, em duplicado e em três gamas (baixa, média e alta) representativas da gama de trabalho. A fortificação das amostras brancas foi realizada segundo a tabela 3 e com soluções de mistura padrão distintas das utilizadas na curva de calibração.

⁹ Soluções de referência da mistura padrão (cocaína, benzoilecgonina, ecgonina metil éster).

¹⁰ Solução da mistura padrão interno (cocaína-D3, benzoilecgonina-D3 e ecgonina metil éster-D3).

Também foi preparada uma alíquota de controlo negativo (amostra branca), que permitiu avaliar o efeito da matriz utilizada (sangue), e um branco de reagentes em que a alíquota de sangue foi substituída por uma porção equivalente de dihidrogenofosfato de potássio a 0,1 M.

Tabela 3 - Amostras de controlo de qualidade interno.

	Soluções de ref. ¹¹ 1 µg/mL	Soluções de ref. ¹¹ 10 µg/mL	Solução de PI ¹² 10 µg/mL
Controlo baixo (100 ng/mL)	50 µL	-	25 µL
Controlo médio (500 ng/mL)		25 µL	25 µL
Controlo alto (1000 ng/mL)	-	50 µL	25 µL
Amostra branca	-	-	25 µL
Branco de reagentes	-	-	25 µL

7.5. **Critérios de aceitação das curvas de calibração, de controlo de qualidade interno e de identificação dos analitos**

Todos os critérios estabelecidos de aceitação das curvas de calibração, de controlo de qualidade interno e de identificação dos analitos são os utilizados no Serviço de Química e Toxicologia Forense do Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses, I.P.

No caso das curvas de calibração apenas foram aceites curvas com valores de correlação linear (r) e de determinação (R^2) superiores a 0,99 e que incluíram o valor zero na interceção da curva com o eixo das ordenadas, para um intervalo de confiança

¹¹ Soluções de referência da mistura padrão (cocaína, benzoilecgonina, ecgonina metil éster).

¹² Solução de padrão interno (cocaína-D3, benzoilecgonina-D3 e ecgonina metil éster-D3).

de 95%. Observou-se a distribuição dos resíduos ao longo dos valores de concentração e excluíram-se valores cujo valor residual fosse superior ao dobro do erro-padrão ($S_{y/x}$) obtido para as curvas de calibração.

A aceitação dos controlos foi efetuada com base na percentagem de exatidão e precisão, sendo que apenas foram aceites aqueles que apresentaram um valor inferior ou igual a 20% e dentro do limite de repetibilidade do método (11%).

A identificação dos analitos, por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa em modo de monitorização seletiva de iões, prevê a reconhecimento de três fragmentos iónicos e, por isso, estabeleceram-se critérios de aceitação para as abundâncias relativas dos sinais iónicos. A abundância relativa de um ião diagnóstico, determinada pela percentagem relativa à intensidade do ião mais intenso (pico base), foi determinada por integração da área do pico cromatográfico selecionado e normalizada ao pico base (que corresponde a 100%).

Como critérios de confirmação qualitativa dos analitos foi estabelecido que a variação do tempo de retenção relativo do composto (TrR), calculado através da razão entre o tempo de retenção do composto e o tempo de retenção do padrão interno, fosse inferior ou igual a 1% quando comparado ao tempo de retenção relativo do padrão do composto em análise. A razão entre o sinal do ião diagnóstico menos intenso e o sinal correspondente ao ruído da linha de base (razão sinal/ruído) foi sempre superior a 3:1. Esta razão foi determinada pela comparação da abundância relativa da m/z do ião diagnóstico selecionado com a abundância relativa da m/z da linha de base adjacente ao pico do composto ($Tr \pm 0,5$ minutos).

A análise quantitativa teve por base o método do padrão interno, em que a concentração dos analitos foi determinada através da razão área do pico do analito/área do pico do padrão interno.

VIII. RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. Estudo do efeito da concentração inicial de cocaína, do conservante, temperatura e tempo de armazenamento na estabilidade da cocaína

Neste estudo avaliou-se o efeito de diversos fatores que influenciam a estabilidade da cocaína em amostras de sangue *post mortem* e *in vivo*: 1) a concentração inicial de cocaína presente nas amostras (100 ng/mL e 1000 ng/mL); 2) a presença ou ausência de fluoreto de sódio (0 e 0,02 g/mL); e 3) a temperatura de conservação das amostras. Para o efeito foram testadas três temperaturas: temperatura ambiente, de refrigeração (2-8°C) e de congelação (-10°C) durante 93 dias.

1.1. Sangue *post mortem*

Nas amostras de sangue *post mortem* com concentrações de 100 e 1000 ng/mL e conservadas com e sem adição de 0,02 g/mL de fluoreto de sódio observou-se que à temperatura ambiente a concentração de cocaína diminuiu ao longo do tempo de forma quase linear (Figura 11A), verificando-se perda total de cocaína ao fim de 64 dias.

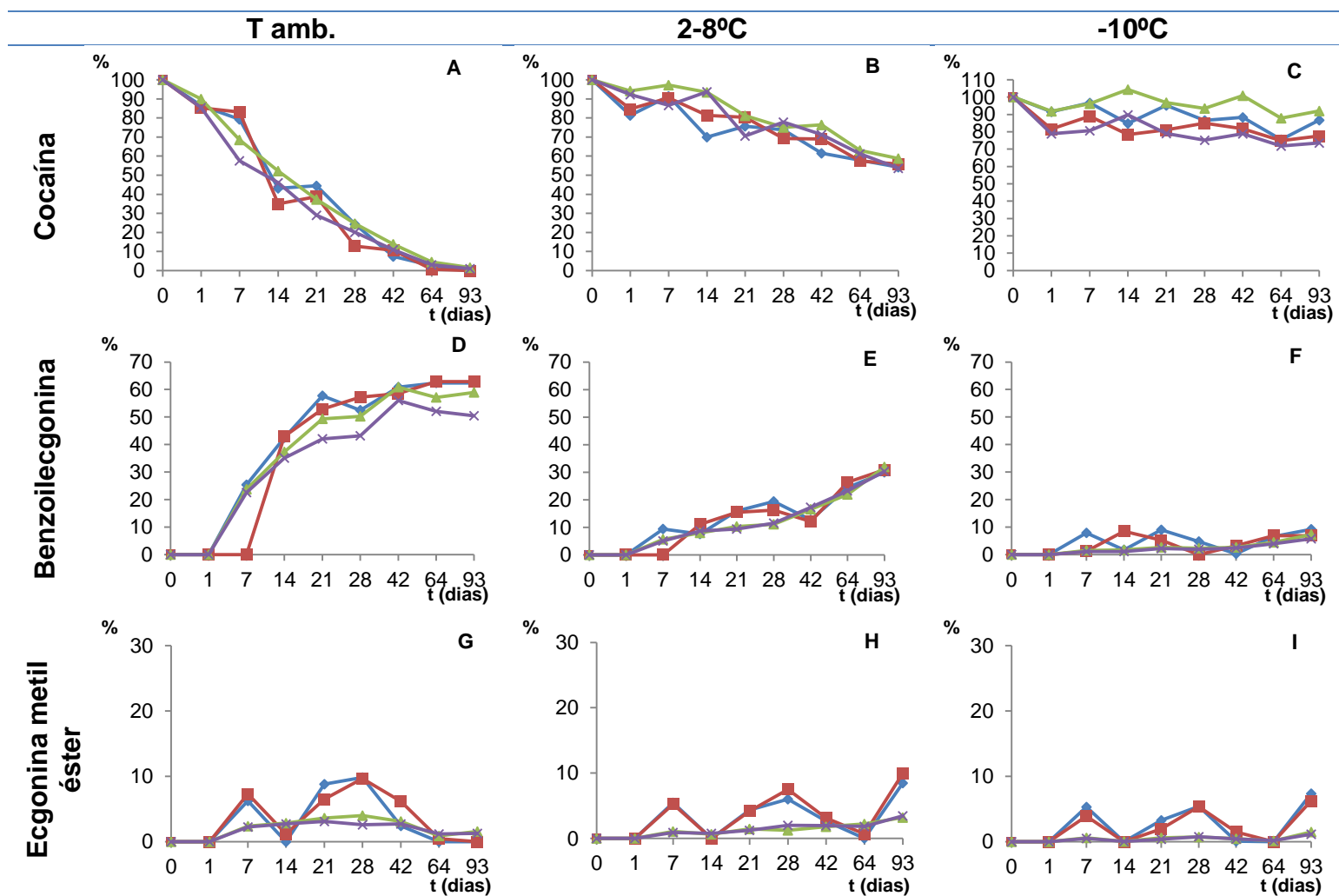


Figura 11 - Variação da percentagem de cocaína, benzoilecgonina e ecgonina metil éster ao longo do tempo (t) em amostras de sangue *post mortem* com 100 ng/mL de cocaína e 0 g/mL de NaF (—♦—), 100 ng/mL de cocaína e 0,02 g/mL de NaF (—■—), 1000 ng/mL de cocaína e 0 g/mL de NaF (—▲—) e 1000 ng/mL de cocaína e 0,02 g/mL de NaF (—×—), sujeitas à temperatura ambiente, 2-8°C e -10°C.

À temperatura de refrigeração (2-8°C) verificou-se uma perda de cerca de 50%, dado que apenas metade da cocaína inicial foi detetada ao fim de 93 dias de armazenamento (Figura 11B) em todas amostras analisadas.

À temperatura de congelação (-10°C), no final do estudo, foram detadas concentrações entre 73 e 92% de cocaína inicialmente presente nas amostras, evidenciando uma maior estabilidade nestas condições de armazenamento (Figura 11C).

Relativamente à formação de benzoilecgonina esta foi crescente ao longo do tempo. No final do estudo, em todas as amostras mantidas à temperatura ambiente os valores percentuais de benzoilecgonina variaram entre 50 e 62% (Figura 11D). Nas amostras mantidas à temperatura de refrigeração (2-8°C) a percentagem de benzoilecgonina foi cerca de 30% (Figura 11E), enquanto à temperatura de congelação (-10°C) foi apenas de 6% (Figura 11F). Não se observaram diferenças relacionadas com as concentrações iniciais de cocaína e de fluoreto de sódio.

Na avaliação da formação de ecgonina metil éster notaram-se padrões de formação/degradação semelhantes nas amostras mantidas às três temperaturas estudadas (Figura 11G, H e I). Verificou-se que a formação deste metabolito nas amostras com concentração da cocaína de 100 ng/mL foi superior quando comparada a concentração de 1000 ng/mL, sendo na ordem dos 10, 8 e 5% para as amostras mantidas à temperatura ambiente, de refrigeração e de congelação, respetivamente.

Os resultados obtidos estão de acordo com estudos anteriores que mostraram que a degradação da cocaína ao longo do tempo está relacionado com o aumento da

temperatura de conservação das amostras de sangue (Baselt, *et al.*, 1983; Isenschmidt *et al.*, 1989; Hippenstiel & Gerson, 1994; Kiszka *et al.*, 2000; Kiszka *et al.*, 2001; Klingman, *et al.*, 2001; Levine *et al.*, 1996; Skoop *et al.*, 2001; Rees *et al.*, 2012).

Enquanto a formação de ecgonina metil éster parecer ser independente da temperatura de conservação, a degradação de cocaína em benzoilecgonina à temperatura ambiente deve-se essencialmente à hidrólise química da cocaína, dado que o mesmo não se verifica à temperatura de congelamento.

A adição de fluoreto de sódio (0,02 g/mL) foi suficiente para inibir a degradação enzimática da cocaína em todas temperaturas estudadas. Estas observações estão acordo com o referido por diversos autores (Baselt *et al.*, 1983; Brogan *et al.*, 1992; Isenschmidt *et al.*, 1989; Rees *et al.*, 2012).

No entanto, é de salientar que, dado a *pool* de sangue *post mortem* ter sido formada a partir de amostras brancas que já continham fluoreto de sódio contrariamente às amostras brancas de sangue *in vivo* (que contêm como conservante fluoreto de potássio e como anticoagulante ácido etilenodiamino tetraacético - EDTA), as poucas diferenças observadas entre as amostras com e sem fluoreto de sódio podem ser um reflexo das amostras *post mortem* sem conservante adicionado já possuírem alguma concentração deste sal (aproximadamente entre 0,5 a 1%).

Neste estudo, à semelhança do descrito na literatura verificou-se que a concentração inicial de cocaína não é um fator relevante na estabilidade deste analito, dado que não foram notadas diferenças entre as duas concentrações de cocaína

testadas (Antonides *et al.*, 2007; Baselt *et al.*, 1983; Baselt *et al.*, 1993; Brogan *et al.*, 1992; Duer *et al.*, 2006; Giorgi & Meeker, 1995; Isenschmid *et al.*, 1989; Kiszka *et al.*, 2001; Mackey-Bojack *et al.*, 2000; Moriya & Hashimoto, 1996; Rees *et al.*, 2012; Skoop *et al.*, 2001).

1.2. **Sangue *in vivo***

Em todas as amostras de sangue *in vivo* que foram mantidas à temperatura ambiente (Figura 12A) verificou-se uma diminuição acentuada da cocaína a partir do 7º dia, em particular nas amostras com a concentração de cocaína mais elevada e sem fluoreto de sódio, com perda total do composto ao 28º dia de estudo.

Ao 7º dia de armazenamento nas amostras mantidas à temperatura de refrigeração (Figura 12B), verificou-se a perda de cerca 36% e 56% da cocaína no caso de amostras com e sem fluoreto de sódio respetivamente, sendo que no final do estudo, apenas nas amostras que continham fluoreto de sódio (0,02 g/mL) foi possível detetar 13% da cocaína inicial.

À temperatura de congelação (-10°C) não se observaram diferenças consideráveis entre as amostras, tendo sido detetado no final do estudo uma concentração de cocaína entre 69% e 76% do valor inicial (Figura 12C).

Relativamente à formação de benzoilecgonina nas amostras de sangue *in vivo* conservadas à temperatura ambiente observaram-se diferenças consideráveis entre as amostras com e sem fluoreto de sódio ao 7º dia de armazenamento (Figura 12D). Ao 28º dia as amostras que continham 0,02 g/mL de fluoreto de sódio apresentaram

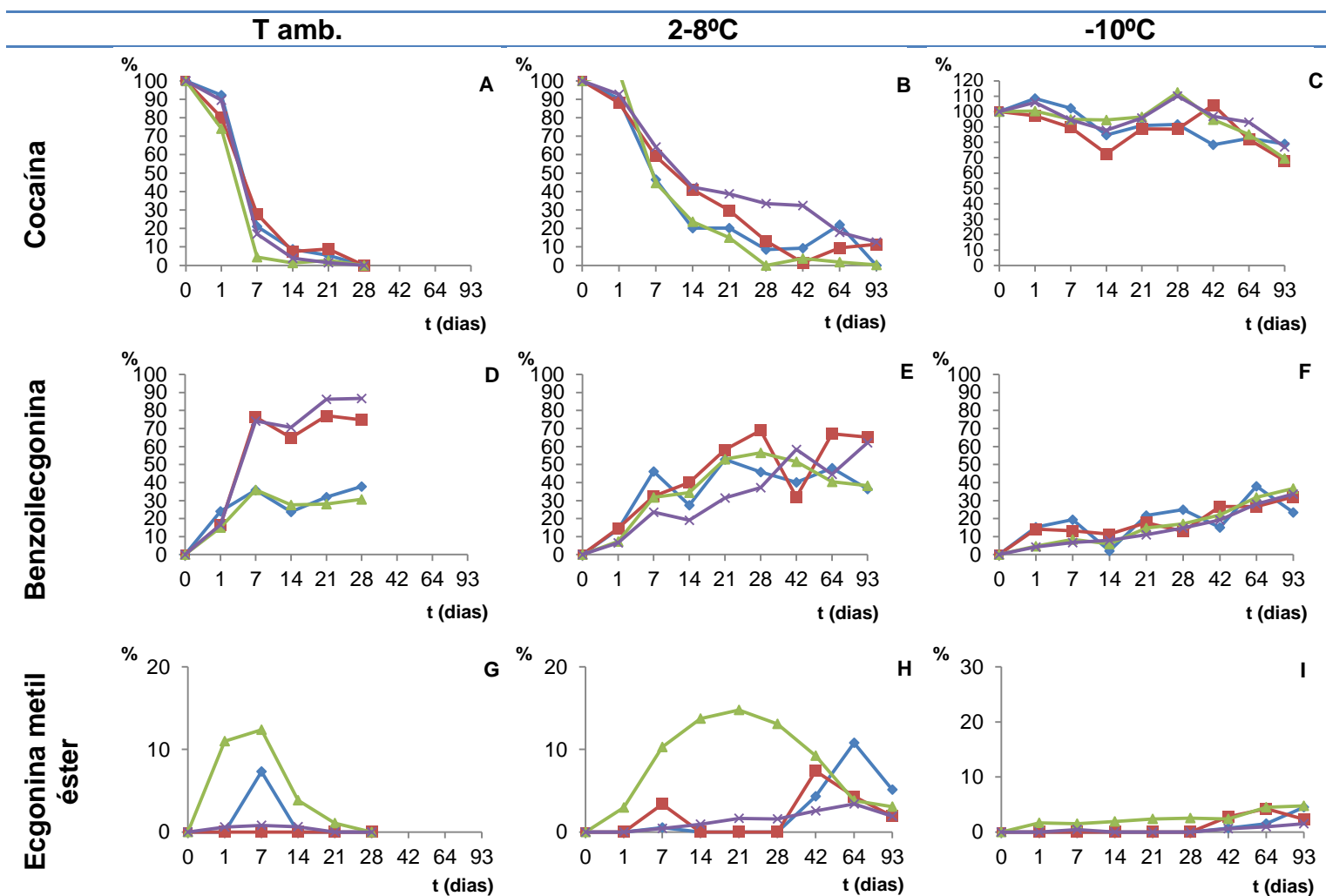


Figura 12 - Variação da percentagem de cocaína, benzoilecgonina e ecgonina metil éster ao longo do tempo (t) em amostras de sangue *in vivo* com 100 ng/mL de cocaína e 0 g/mL de NaF (—♦—), 100 ng/mL de cocaína e 0,02 g/mL de NaF (—■—), 1000 ng/mL de cocaína e 0 g/mL de NaF (—▲—) e 1000 ng/mL de cocaína e 0,02 g/mL de NaF (—×—), sujeitas à temperatura ambiente, 2-8°C e -10°C.

formação de benzoilecgonina na ordem dos 80%, contrastando com os valores obtidos nas amostras em que não foi adicionado fluoreto de sódio em que se verificou apenas 30%.

Nas amostras conservadas à temperatura de refrigeração e com 0,02 g/mL de fluoreto de sódio, no final do estudo, a formação de benzoilecgonina foi de cerca 62%, valor superior ao observado nas amostras em que não foi adicionado o conservante (38%) (Figura 12E).

Nas amostras conservadas a -10°C a formação de benzoilecgonina foi menos expressiva comparativamente ao observado nas outras temperaturas e independente da concentração de fluoreto de sódio e de cocaína, sendo que os valores percentuais variaram entre 23 e 34% no final do estudo (Figura 12F).

No que diz respeito à formação de ecgonina metil éster, à temperatura ambiente observaram-se diferenças entre as amostras com e sem fluoreto de sódio, sendo, nestas últimas, superior (Figura 12G), tendo-se observado o valor percentual mais elevado nas amostras com 1000 ng/mL e com fluoreto de sódio ao 7º dia (12%).

À temperatura de refrigeração notou-se a mesma tendência observada à temperatura ambiente para as amostras sem fluoreto de sódio (Figura 12H). Porém, a formação deste metabolito nas amostras testadas não ocorreu no mesmo momento do estudo, tendo sido escalonada ao longo do tempo. Nas amostras com 1000 ng/mL de cocaína detetou-se 15% de ecgonina metil éster ao 21º dia e nas amostras com 100 ng/mL registou-se 11% ao 64º dia de armazenamento. A esta temperatura, contrariamente ao que ocorreu nas amostras conservadas à temperatura ambiente,

também foi detetada formação de ecgonina metil éster nas amostras com fluoreto de sódio, tendo-se verificado, respetivamente, 4 e 7% nas amostras com 1000 e 100 ng/mL de cocaína.

À temperatura de congelação (-10°C), apesar da formação de ecgonina metil éster ter sido muito reduzida, as concentrações detetadas nas amostras sem fluoreto de sódio foram ligeiramente superiores às registadas nas amostras em que foi adicionado o conservante (Figura 12I).

Em resumo, nas amostras de sangue *in vivo* pode destacar-se que a diminuição da temperatura de conservação favorece a estabilidade de cocaína ao longo do tempo de armazenamento. Estes resultados estão de acordo com os descritos na literatura (Baselt, *et al.*, 1983; Isenschmid *et al.*, 1989; Hippenstiel & Gerson, 1994; Kiszka *et al.*, 2000; Kiszka *et al.*, 2001; Klingman, *et al.*, 2001; Levine *et al.*, 1996; Skoop *et al.*, 2001; Rees *et al.*, 2012).

Relativamente à formação de benzoilecgonina verifica-se uma grande diferença entre as amostras com e sem fluoreto de sódio mantidas à temperatura ambiente e de refrigeração. Nas amostras em que não foi adicionado o conservante, a formação de benzoilecgonina foi menos expressiva, o que poderá ser explicado pela formação concomitante de ecgonina metil éster nestas amostras.

Os resultados obtidos relativamente à formação de ecgonina metil éster confirmam que o fluoreto de sódio parece inibir a sua formação. Tal como descrito por diversos autores, a ação da pseudocolinesterase presente no plasma e consequente

formação deste metabolito é inibida pelo fluoreto de sódio (Baselt *et al.*, 1983, Brogan *et al.*, 1992, Isenschmid *et al.*, 1989, Rees *et al.*, 2012).

Relativamente ao efeito da adição do fluoreto de sódio como conservante das amostras, este sal demonstrou ter uma ação mais relevante nas amostras *in vivo*, visto que verificaram-se diferenças consideráveis entre as amostras com e sem fluoreto de sódio conservadas à temperatura ambiente e de refrigeração, nomeadamente em relação à formação de benzoilecgonina e ecgonina metil éster. Verificou-se que nas amostras em que não foi adicionado o conservante a formação de benzoilecgonina foi menos expressiva e houve formação concomitante de ecgonina metil éster. Nestas amostras, cuja *pool* original continha fluoreto de potássio e anticoagulante, a formação de ecgonina metil éster foi favorecida pela ausência de fluoreto de sódio, conduzindo, deste modo, à diminuição da formação de benzoilecgonina. Este fenómeno não foi notado nas amostras de sangue *post mortem*, cuja *pool* continha entre 0,5% e 1% de fluoreto de sódio, como mencionado anteriormente.

No entanto, à temperatura de refrigeração a concentração de fluoreto de sódio adicionada não terá sido suficiente para inibir totalmente a hidrólise da cocaína em ecgonina metil éster, uma vez que foram ainda observadas concentrações deste metabolito nas amostras com conservante, contrastando com o observado às temperaturas ambiente e de congelação. Este resultado sugere uma forte atividade da pseudocolinesterase nesta gama de temperaturas, onde poderá estar inserida a sua temperatura ótima.

Em relação ao efeito da concentração de cocaína inicial na estabilidade do composto não se observaram diferenças entre as duas concentrações de cocaína testadas tal como descrito por outros autores (Antonides *et al.*, 2007; Baselt *et al.*, 1983; Baselt *et al.*, 1993; Brogan *et al.*, 1992; Duer *et al.*, 2006; Giorgi & Meeker, 1995; Isenschmid *et al.*, 1989; Kiszka *et al.*, 2001; Mackey-Bojack *et al.*, 2000; Moriya & Hashimoto, 1996; Rees *et al.*, 2012; Skoop *et al.*, 2001).

1.3. Efeito do pH nas amostras de sangue *post mortem* vs *in vivo*

Ao compararem-se os resultados obtidos nos dois tipos de sangue (Figura 11 e 12), nomeadamente à temperatura ambiente, observou-se que a hidrólise da cocaína foi superior no sangue *in vivo*. A perda total do composto no sangue *in vivo* ocorreu ao 28º dia de armazenamento enquanto no sangue *post mortem* se verificou apenas ao 93º dia em todas as amostras. Estas diferenças devem-se provavelmente ao valor de pH das amostras, em que no caso do sangue *post mortem* foi de 6,68 e *in vivo* de 7,38. Deste modo, confirma-se que também o pH das amostras parece ter um papel muito importante na hidrólise da cocaína no sangue, sendo que quanto mais elevado é o seu valor menos estável é a cocaína, tal como descrito por Isenschmid *et al.* (1989) e Moriya & Hashimoto (1996).

2. Estudo do efeito do ácido ascórbico, temperatura e tempo de armazenamento na estabilidade da cocaína

Neste estudo, avaliou-se o efeito da adição do ácido ascórbico na estabilidade da cocaína em amostras de sangue *post mortem* e *in vivo*. Foi testada a concentração de 3 mg/mL em amostras que apresentavam 1000 ng/mL e 0,02 g/mL de fluoreto de sódio. As amostras foram conservadas a três temperaturas distintas (temperatura ambiente, 2-8°C e -10°C) e analisadas aos 0, 1, 7, 14, 21, 28, 42, 64 e 93 dias de armazenamento.

2.1. Sangue *post mortem*

Notaram-se diferenças entre as amostras com e sem ácido ascórbico mantidas à temperatura ambiente, registrando-se uma diminuição quase linear da concentração de cocaína na ausência do ácido ascórbico (Figura 13A). No final do estudo detetaram-se, respetivamente, 40 e 7% de cocaína em amostras com e sem ácido ascórbico.

À temperatura de refrigeração (2-8°C) no final do estudo, os valores registados foram de 82% da cocaína nas amostras com ácido ascórbico, enquanto nas amostras sem ácido apenas de 64% (Figura 13B).

À temperatura de congelação (-10°C) as diferenças entre as amostras com e sem ácido ascórbico não foram expressivas, dado que no final do estudo foi detetada, respetivamente, 92 e 87% da cocaína presente inicialmente (Figura 13C).

VIII. RESULTADOS E DISCUSSÃO

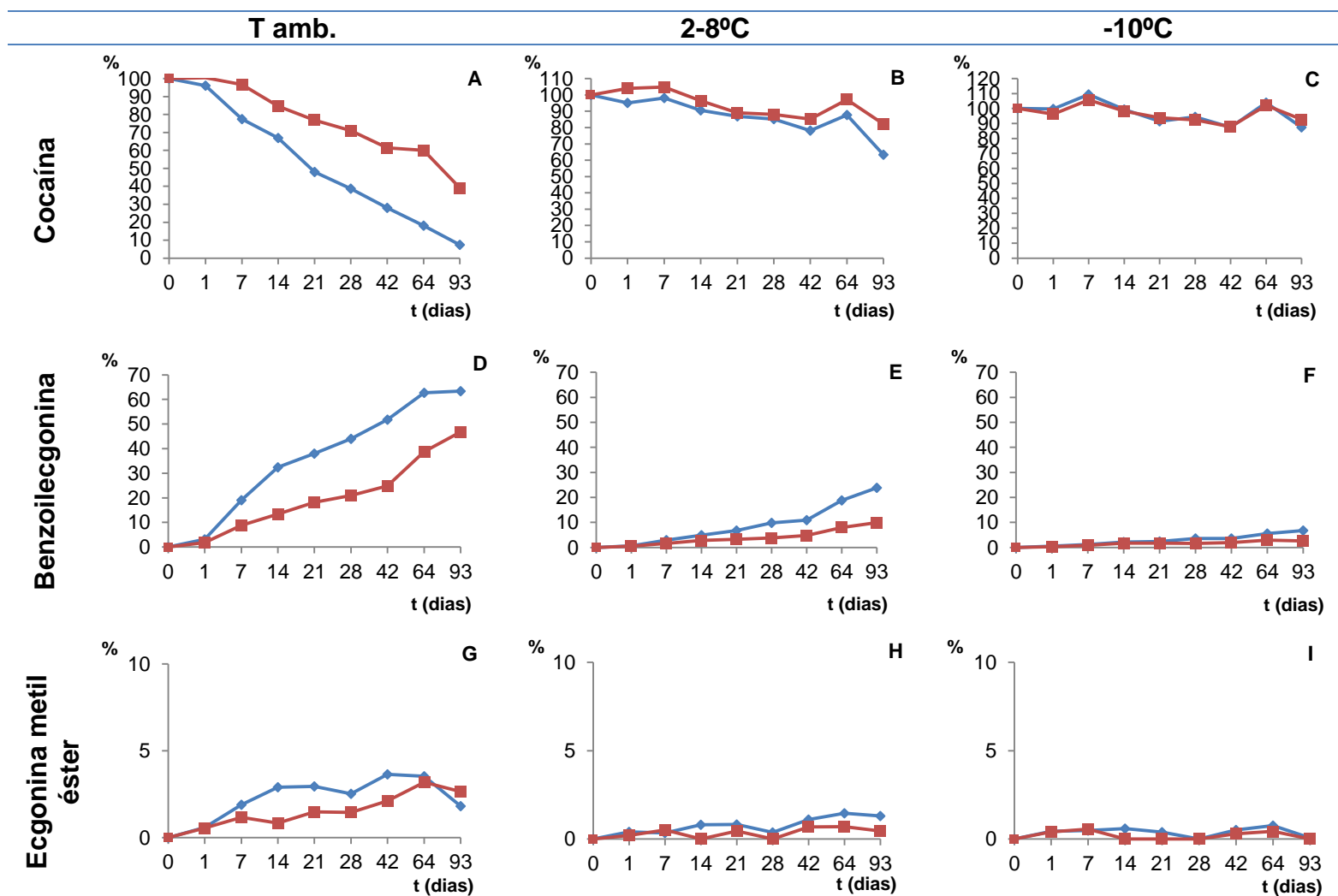


Figura 13 - Variação da percentagem de cocaína, benzoilecgonina e ecgonina metil éster ao longo do tempo (t) em amostras de sangue *post mortem* com 1000 ng/mL de cocaína, 0,02 g/mL de NaF às quais foi aplicado 0 mg/mL (—♦—) e 3 mg/mL (—■—) de ácido ascórbico, sujeitas à temperatura ambiente, 2-8°C e -10°C.

Relativamente à formação de benzoilecgonina nas amostras sem ácido ascórbico e mantidas à temperatura ambiente, no final do estudo foi detetada 64%, que contrasta bastante com o valor de 47% registado para as amostras com ácido ascórbico (Figura 13D).

À temperatura de 2-8°C observou-se que a formação de benzoilecgonina ocorreu de forma menos acentuada do que à temperatura ambiente em ambos os tipos de amostras, sendo que a partir do 21º dia notam-se diferenças consideráveis entre as amostras com e sem ácido. No final do estudo nas amostras sem ácido ascórbico detetou-se 24% de benzoilecgonina, enquanto nas que continham o ácido ascórbico registou-se apenas 10% (Figura 13E).

À temperatura de congelação a formação de benzoilecgonina foi inibida em ambas as amostras analisadas, não excedendo no final do estudo os 7% (Figura 13F).

No que diz respeito à formação de ecgonina metil éster por hidrólise da cocaína registaram-se concentrações residuais em todas as temperaturas, apesar de à temperatura ambiente se observar uma maior percentagem de formação de ecgonina metil éster nas amostras sem ácido ascórbico (Figuras 13G, H e I).

Neste estudo comprovou-se que o ácido ascórbico tem um papel muito importante na estabilidade da cocaína em amostras *post mortem*, nomeadamente à temperatura ambiente e de refrigeração, tendo sido detetadas concentrações de cocaína bastante superiores nas amostras conservadas com este ácido, estando de acordo com os resultados obtidos em amostras de urina por Baselt & Chang (1987).

A formação de benzoilecgonina é muito dependente da temperatura, mas a acidificação das amostras com ácido ascórbico promoveu a inibição da hidrólise química e consequente formação deste metabolito. Assim sendo, a inibição da degradação da cocaína por via química foi superior nas amostras com o ácido ascórbico, tal como tinha sido descrito para amostras de urina por Baselt & Chang (1987).

No que diz respeito à ecgonina metil éster não foram detetadas concentrações relevantes, visto que todas as amostras analisadas continham fluoreto de sódio que, tal como foi comprovado no estudo anterior e por diversos autores, inibe a conversão enzimática da cocaína em ecgonina metil éster (Baselt *et al.*, 1983, Brogan *et al.*, 1992, Isenschmid *et al.*, 1989, Rees *et al.*, 2012). No entanto, a adição de ácido ascórbico também inibiu a formação deste metabolito.

2.2. Sangue *in vivo*

Nas amostras de sangue *in vivo* conservadas à temperatura ambiente observou-se que a hidrólise da cocaína foi mais reduzida nas que continham ácido ascórbico, sendo que no final do estudo detetou-se 25% da cocaína inicial. Nas amostras sem ácido ascórbico a cocaína perdeu-se totalmente ao 28º dia de armazenamento (Figura 14A).

Nas amostras conservadas à temperatura de refrigeração e sem ácido ascórbico no final do estudo registou-se 22% de cocaína, contrastando com o valor de 68% obtido nas amostras com o ácido ascórbico (Figura 14B).

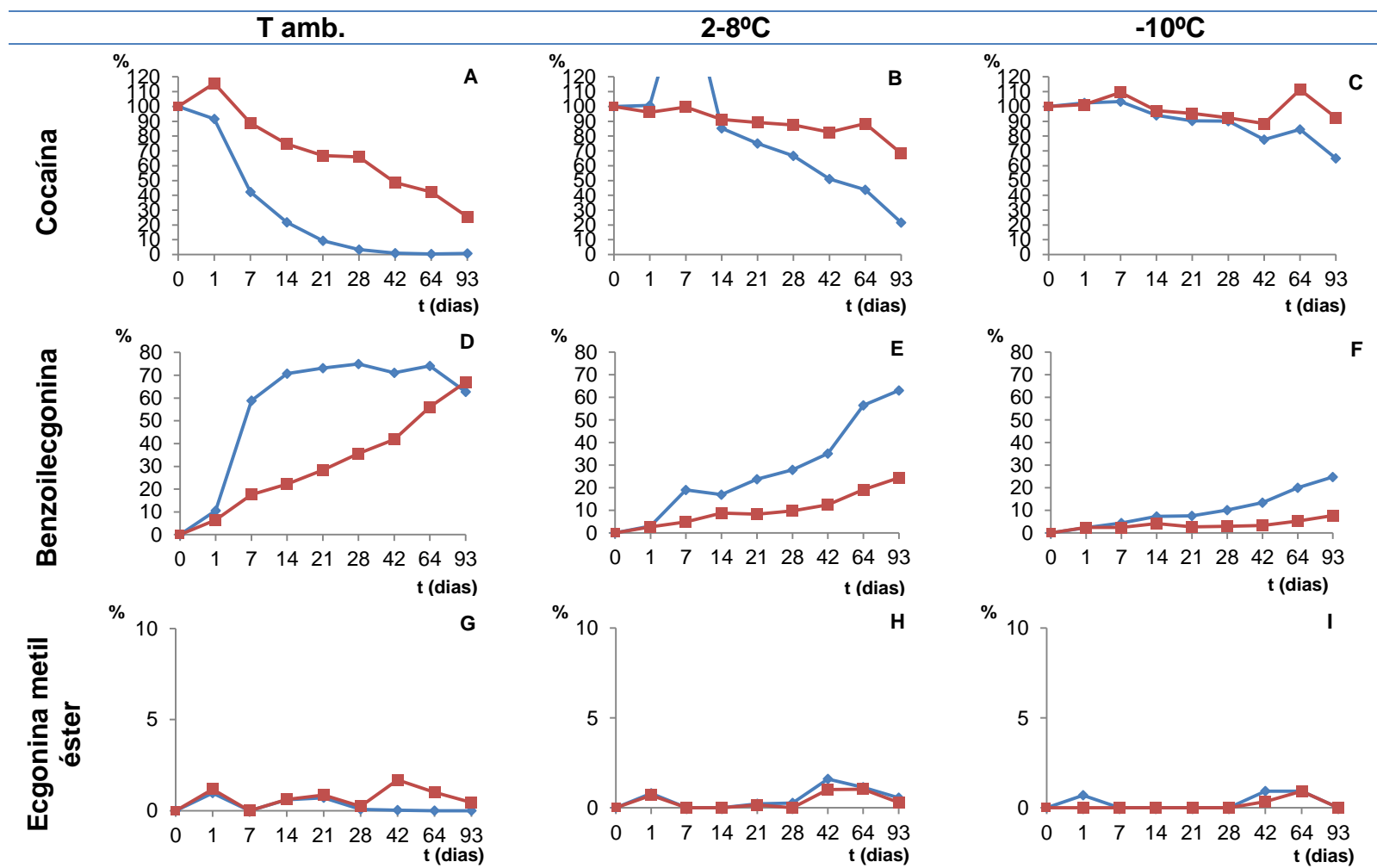


Figura 14 - Variação da percentagem de cocaína, benzoilecgonina e ecgonina metil éster ao longo do tempo (t) em amostras de sangue *in vivo* com 1000 ng/mL de cocaína, 0,02 g/mL de NaF às quais foi aplicado 0 mg/mL (—♦—) e 3 mg/mL (—■—) de ácido ascórbico, sujeitas à temperatura ambiente, 2-8°C e -10°C.

À temperatura de congelação (-10°C), as amostras apresentaram concentrações de cocaína mais elevadas do que nas conservadas às outras temperaturas (Figura 14C). Neste caso, ao 93º dia, as amostras às quais não foi adicionado ácido ascórbico apresentaram 65% de cocaína, contrastando claramente com o valor de 93% verificado nas que continham o ácido.

No que diz respeito à formação de benzoilecgonina à temperatura ambiente, nas amostras sem ácido ascórbico registou-se 60% deste metabolito ao 7º dia de armazenamento, valor que aumentou até aos 74% ao 64º dia (Figura 14D), momento ao qual se verifica a hidrólise total da cocaína. À mesma temperatura nas amostras com ácido ascórbico a formação de benzoilecgonina foi menos acentuada, tendo sido registados 18 e 67% no 7º e 93º dia de armazenamento, respetivamente.

No fim do estudo, nas amostras mantidas à temperatura de refrigeração ($2-8^{\circ}\text{C}$) (Figura 14E) e que não continham ácido ascórbico, a formação de benzoilecgonina (63%) foi superior à observada nas amostras conservadas com ácido ascórbico (24%).

À temperatura de congelação (-10°C) a hidrólise da cocaína em benzoilecgonina foi mais reduzida do que nas outras temperaturas testadas, sendo que, ao 93º dia de armazenamento, nas amostras com ácido ascórbico registou-se 8%, contrastando com os 25% de benzoilecgonina detetados nas amostras sem ácido ascórbico (Figura 14F).

Em relação à formação de ecgonina metil éster observou-se que em todas as temperaturas testadas as concentrações deste metabolito foram residuais (Figura 14G, H e I). No entanto, naquelas que não continham ácido ascórbico foram detetadas

concentrações superiores de ecgonina metil éster. A formação de ecgonina metil éster nas amostras de sangue *in vivo* foi quase totalmente inibida nas três temperaturas, visto que, tal como ocorreu nas amostras de sangue *post mortem*, a ação da pseudocolinesterase não é inibida pela diminuição de pH, mas através da adição do fluoreto de sódio que estava presente em todas as amostras, como foi comprovado anteriormente (Baselt *et al.*, 1983, Brogan *et al.*, 1992, Isenschmid *et al.*, 1989, Rees *et al.*, 2012).

A adição de ácido ascórbico mostrou ter um papel fundamental na estabilidade da cocaína em amostras *in vivo*. A acidificação desta matriz biológica, que apresenta um pH neutro (7,38), inibiu a hidrólise química da cocaína, diminuindo principalmente a formação de benzoilecgonina, tal como tinha sido descrito na urina (Baselt & Chang, 1987).

2.3. Efeito do pH nas amostras de sangue *post mortem* vs *in vivo*

Comparando os resultados obtidos nos dois tipos de sangue verificou-se que nas amostras de sangue *in vivo* e *post mortem* a conjugação da adição de ácido ascórbico e a temperatura de conservação de congelção (-10°C) foi eficaz na estabilidade da cocaína durante 93 dias de armazenamento.

Neste estudo, comprovou-se que a degradação da cocaína em benzoilecgonina, além do tempo e da temperatura de conservação, é dependente do pH das amostras, sendo inibida em amostras ácidas, estando de acordo com os resultados obtidos por Isenschmid *et al.* (1989) e Moriya & Hashimoto (1996).

Os valores de pH alcançados nas amostras de sangue *in vivo* sem ácido ascórbico e com ácido ascórbico foram de, respetivamente, 7,38 e 6,73. No sangue *post mortem* sem e com ácido ascórbico os valores de pH foram de 6,68 e 6,15, respetivamente. O facto das amostras de sangue *post mortem* com ácido ascórbico apresentarem o valor de pH mais baixo permitiu que a cocaína nessas amostras se mantivesse estável por um maior período de tempo nas três temperaturas testadas.

A formação de benzoilecgonina foi igualmente inibida pela acidificação das amostras de ambos os tipos de sangue, sendo que a hidrólise química da cocaína foi menor quando foi adicionado o ácido ascórbico. No entanto, as amostras de sangue *in vivo* foram afetadas mais cedo pela ausência de ácido ascórbico, tendo-se registado concentrações bastante elevadas deste metabolito nos primeiros 7 dias de armazenamento à temperatura ambiente.

O valor de pH das amostras não pareceu ter um efeito importante na hidrólise enzimática da cocaína, dado que relativamente à formação de ecgonina metil éster não foram notadas diferenças entre os dois tipos de sangue estudados.

3. Estudo da estabilidade da cocaína após ciclos de congelação/descongelação

Neste estudo foi avaliado o efeito da realização de 3 ciclos de congelação/descongelação em amostras *post mortem* e *in vivo* e teve como objetivo simular a rotina a que estão sujeitas as amostras analisadas no Serviço de Química e Toxicologia Forense.

O tratamento estatístico foi efetuado mediante a utilização do teste *T-Student* (emparelhadas) com um nível de significância de 5% ($\alpha=0,05$)

Observaram-se diferenças estatisticamente significativas ($p<0,05$) em relação à média das concentrações de cocaína entre as amostras que foram sujeitas a 1 e 3 ciclos de congelação/descongelação em sangue *post mortem* e *in vivo* (Tabela 4).

Apesar de os estudos de Concheiro *et al.* (2011), Concheiro *et al.* (2010), Dams *et al.* (2003), Lin *et al.* (2001) e Xiong *et al.* (2013) indicarem que a cocaína permanece estável durante pelo menos 3 ciclos de congelação/descongelação em diferentes matrizes biológicas, neste trabalho registaram-se diferenças estatisticamente significativas ($p<0,05$) nas amostras de sangue *post mortem* e *in vivo*. Porém, esta diferença foi mais expressiva nas amostras de sangue *in vivo*. Isto poderá dever-se ao facto de que estas amostras são menos ácidas do que as de sangue *post mortem*

Tabela 4 - Média, desvio-padrão, coeficiente de variação e recuperação das concentrações de cocaína obtidas em amostras com 1000 ng/mL de cocaína e 0,02 g/mL de fluoreto de sódio após o primeiro e terceiro ciclos de congelação/descongelação.

Tipo de amostra	Sangue <i>post mortem</i> ¹³		Sangue <i>in vivo</i> ¹⁴	
	1000 ng/mL		1000 ng/mL	
Ciclo de congelação/ descongelação	1º	3º	1º	3º
Média (N=3)	1136,9	1005,8	1064,1	851,0
Desvio padrão	35,4	10,6	16,6	14,5
Coeficiente de variação (%)	3,1	1,1	1,6	1,7
Recuperação (%)	113,7	100,6	106,4	85,1

¹³ Com diferenças significativas ($t= 7,39$; $p= 0,018$).

¹⁴ Com diferenças significativas ($t= 20,43$; $p= 0,002$).

que, como foi observado no decorrer deste trabalho, provoca maior instabilidade da cocaína conjugado com a sua maior susceptibilidade a diferenças de temperatura.

Deste modo, para evitar a degradação da cocaína devido aos ciclos de congelamento/descongelamento sugere-se que, na rotina diária do laboratório, se proceda à divisão do volume total da amostra em alíquotas de menor volume.

4. Estudo da estabilidade da cocaína em extratos derivatizados

Neste estudo foi avaliada a estabilidade da cocaína em amostras processadas, nomeadamente nos extratos derivatizados. Para o efeito, os extratos foram reinjetados 48h e 8 dias após a primeira injeção no sistema cromatográfico.

O tratamento estatístico foi efetuado mediante a utilização da análise de variância (ANOVA) com um nível de significância de 5 % ($\alpha=0,05$).

Observou-se que as concentrações de cocaína nos extratos derivatizados não são alteradas significativamente ($p>0,05$) até 8 dias após a derivatização (Tabela 5).

Tabela 5 - Média, desvio-padrão, coeficiente de variação e recuperação das concentrações de cocaína obtidas em extratos imediatamente após derivatização ou após 48h e 8 dias (d).

Concentração de cocaína teórica	1000 ng/mL ¹⁵		
Tempo após derivatização	0h	48h	8d
Média (N=2)	1160,9	1127,3	1085,5
Desvio-padrão	25,4	24,7	35,2
Coeficiente de variação (%)	2,2	2,2	3,2
Recuperação (%)	116,1	112,7	108,5

¹⁵ Sem diferenças significativas ($F= 1,72$; $p=0,317$).

A partir destes resultados conclui-se que quando ocorrem atrasos inesperados durante a análise, devidos, por exemplo, a uma avaria do equipamento cromatográfico e consequente interrupção da sequência analítica, as concentrações de cocaína não diferem daquelas que seriam obtidas se o processo decorresse normalmente.

IX. CONCLUSÕES

A estabilidade da cocaína em amostras de sangue mostrou ser bastante influenciada pelos fatores que estão relacionados com a fase pré-analítica, sendo que o tempo de armazenamento, a temperatura de conservação e a adição de fluoreto de sódio e ácido ascórbico mostraram influenciar a estabilidade da cocaína.

Relativamente ao tempo de armazenamento das amostras de sangue *post mortem* e *in vivo* comprovou ser um fator determinante na estabilidade da cocaína, visto que se verificou uma diminuição da concentração de cocaína ao longo dos 93 dias do estudo em todas as condições testadas.

Quanto ao efeito da temperatura de conservação das amostras *post mortem* e *in vivo* demonstrou-se que a degradação da cocaína ao longo do tempo é mais evidente a temperaturas de conservação mais elevadas. A temperatura de congelação (-10°C) garantiu uma maior estabilidade da cocaína, sendo que a perda variou entre 9% e 27% no caso das amostras de sangue *post mortem* e entre 24% e 31% nas amostras *in vivo*, ao fim de 93 dias de armazenamento. Estes valores contrastaram com os observados nas amostras mantidas à temperatura ambiente em que houve perda total da cocaína ao fim de 64 e 28 dias de armazenamento para as amostras de sangue *post mortem* e *in vivo*, respetivamente.

A estabilidade da cocaína em amostras de sangue *post mortem* e *in vivo* foi independente da concentração inicial da mesma.

A adição do fluoreto de sódio às amostras de sangue *post mortem* e *in vivo* não originou diferenças importantes na estabilidade da cocaína ao longo do tempo de armazenamento. Contudo, foram notadas diferenças relativamente à percentagem de formação dos seus metabolitos benzoilecgonina e ecgonina metil éster nas amostras de sangue *in vivo*.

A ausência de fluoreto de sódio, nas amostras de sangue *in vivo*, favoreceu a formação de ecgonina metil éster e, por consequência, a diminuição da formação de benzoilecgonina.

A acidificação das amostras de sangue com ácido ascórbico favoreceu a estabilidade da cocaína, em particular, à temperatura ambiente e de refrigeração (2-8°C). À temperatura de congelação, nas amostras de sangue *in vivo* que continham ácido ascórbico detetou-se 92% de cocaína, que contrastou com o valor de 64% obtido para as amostras sem ácido ascórbico aos 93 dias de armazenamento.

A formação de benzoilecgonina é muito dependente da temperatura, sendo favorecida à temperatura ambiente e de refrigeração (2-8°C), mas a acidificação das amostras de sangue com ácido ascórbico promoveu a inibição da hidrólise química e consequente formação deste metabolito.

Nas amostras de sangue *post mortem* a degradação da cocaína foi inferior quando comparada com a verificada nas amostras *in vivo*, dado que as amostras de sangue *post mortem* apresentam um pH 6,68, valor mais ácido do que o observado

nas amostras de sangue *in vivo* (7,38). Esta observação evidencia a relação entre a estabilidade da cocaína e o pH das amostras, sendo favorecida em amostras ácidas.

A conjugação da conservação das amostras de sangue à temperatura de congelamento (-10°C), com 0,02 g/mL de fluoreto de sódio e 3 mg/mL de ácido ascórbico, permitiu manter estável a concentração da cocaína durante 93 dias, sendo esta a primeira vez que este ácido foi utilizado como conservante das amostras de sangue para prevenir a degradação da cocaína.

Os três ciclos de congelamento/descongelamento afetaram a estabilidade da cocaína nas amostras de sangue, uma vez que se verificaram diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) nas concentrações do analito.

A cocaína revelou-se estável em extratos derivatizados durante pelo menos 8 dias, uma vez que não verificaram diferenças estatisticamente significativas nas concentrações do analito ($p > 0,05$).

X. PERSPETIVAS FUTURAS

Dado a relevância do tema seria importante efetuar diversos estudos que complementem este trabalho, nomeadamente um mais abrangente relativo ao efeito da concentração do ácido ascórbico como conservante de amostras de sangue.

Será também importante observar se a adição do ácido ascórbico às amostras de sangue influencia a estabilidade de outras drogas ou medicamentos que possam estar presentes nas mesmas, como, por exemplo, a 6-monoacetilmorfina.

A estabilidade da cocaína após as amostras serem sujeitas a vários ciclos de congelação/descongelação também deverá ser estudada em amostras acidificadas com ácido ascórbico.

Seria relevante avaliar a estabilidade dos principais metabolitos da cocaína, nomeadamente a benzoilecgonina e a ecgonina metil éster.

Dado que as amostras biológicas são armazenadas, no mínimo, durante três anos no laboratório a -10°C, seria relevante a realização de um estudo de estabilidade durante esse intervalo de tempo.

É fundamental que se avalie a estabilidade da cocaína noutras matrizes biológicas que não sejam tão suscetíveis aos mecanismos de decomposição *post mortem*. Uma amostra que poderá ser importante neste sentido é o humor vítreo que, pela sua localização anatómica, está bastante protegido dos fenómenos que ocorrem posteriormente à morte.

XI. DIVULGAÇÃO NA COMUNIDADE CIENTÍFICA

Este trabalho foi divulgado na comunidade científica em encontros nacionais e internacionais.

1. Comunicações em painel

- Mourato C, Costa S, Dias M. Avaliação da estabilidade de cocaína e metabolitos em amostras de sangue post-mortem e in vivo. – 8º Congresso Nacional de Cromatografia, de 2 a 4 de Dezembro de 2013, Covilhã, Portugal.
- Mourato C, Costa S, Dias M. Cocaine stability in blood: study and optimization. – 51st Annual Meeting of the International Association of Forensic Toxicologists, de 2 a 6 de Setembro de 2013, Funchal, Portugal.

2. Comunicações orais

- Mourato C, Costa S, Dias M. Estabilidade da cocaína no sangue. – II Jornadas Ibéricas de Toxicologia, 13 e 14 de Novembro de 2014, Covilhã, Portugal.
- Mourato C, Costa S, Dias M. Estabilidade da cocaína no sangue: estudo e otimização. – 12º Congresso Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses, de 7 a 9 de Novembro de 2013, Porto, Portugal.

XII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Allan A.R., Roberts I.S. (2008). Post-mortem toxicology of commonly-abused drugs. *Diagnostic Histopathology*, 15: 33-41.
- Alter M.J. (1997). Epidemiology of Hepatitis C. *Hepatology*, 26: 62-65.
- Antonides H.M., Kiely E.R., Marinetti L.J. (2007). Vitreous fluid quantification of opiates, cocaine, and benzoylecgonine: comparison of calibration curves in both blood and vitreous matrices with corresponding concentrations in blood. *Journal of Analytical Toxicology*, 31: 469-476.
- Barroso M., Dias M., Vieira D.N., Queiroz J.A., Lopez-Rivadulla M. (2008). Development and validation of an analytical method for the simultaneous determination of cocaine and its main metabolite, benzoylecgonine, in human hair by gas chromatography/mass spectrometry. *Rapid Communications Mass Spectrometry*, 22: 3320-3326.
- Barroso M., Gallardo E., Queirós J.A. (2009). Bioanalytical methods for the determination of cocaine and metabolites in human biological samples. *Bioanalysis*, 1: 977-1000.

- Baselt R.C. (1983). Stability of cocaine in biological fluids. *Journal of Chromatography*, 268: 502-505.
- Baselt R.C., Chang R. (1987). Urinary excretion of cocaine and benzoylecgonine following oral ingestion in a single subject. *Journal of Analytical Toxicology*, 11: 81-82.
- Baselt R.C., Yoshikawa D., Chang J., Li J. (1993). Improved long-term stability of blood cocaine in evacuated collection tubes. *Journal of Forensic Sciences*, 38: 935-937.
- Berg T., Lundanes E., Christophersen A.S., Strand D.H. (2009). Determination of opiates and cocaine in urine by high pH mobile phase reversed phase UPLC-MS/MS. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 877: 421-432.
- Bertol E., Trignano C., Milia M.G., Padua M., Mari F. (2008). Cocaine related-deaths: an enigma still under investigation. *Forensic Science International*, 176: 121-123.
- Boelsterli U.A., Göldlin C. (1991). Biomechanisms of cocaine-induced hepatocyte injury mediated by the formation of reactive metabolites. *Archives of Toxicology*, 65: 351-360.
- Boghdadi M.S., Henning R. J., (1997). Cocaine: Pathophysiology, Clinical toxicology. *Heart & Lung*, 26: 466-483.
- Bouzas N.F., Dresen S., Munz B., Weinmann W. (2009). Determination of basic drugs of abuse in human serum by online extraction and LC-MS/MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 395: 2499-2507.

- Brogan W.C., Kemp P.M., Bost R.O., Glamann D.B., Lange R.A., Hillis L.D. (1992). Collection and handling of clinical blood samples to assure the accurate measurement of cocaine concentration. *Journal of Analytical Toxicology*, 16: 152-154.
- Brunet B.R., Barnes A.J., Mura P., Huestis M.A (2008). Development and validation of a solid-phase extraction gas chromatography-mass spectrometry method for the simultaneous quantification of methadone, heroin, cocaine and metabolites in sweat. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 392: 115-127.
- Brunetto M., Delgado Y., Clavijo S. Contreras Y., Torres D., Ayala C., Galignami M., Forteza R., Cerda Martin V. (2010). Analysis of cocaine and benzoylecgonine in urine by using multisyringe flow injection analysis-gas chromatography-mass spectrometry system. *Journal of Separation Sciences*, 33: 1779-1786.
- Bueis A.B., Veja A.P., Ramos J.L.S., Pérez J.A.M., García R.A., Jiménez D.G., Llave E.P. (2002). Bronchial hyperreactivity in patients who inhale heroin mixed with cocaine vaporized on aluminum foil. *CHEST Journal*, 121: 1223-1230.
- Büttner A., Mall G., Penning R., Sachs H., Weis S. (2003). The neuropathology of cocaine abuse. *Legal Medicine*, 5: S240-S242.
- Butzbach D.M. (2010). The influence of putrefaction and sample storage on post-mortem toxicology results. *Forensic Science Medicine and Pathology*, 6: 35–45.

- Cardona P.S., Chaturvedi A.K., Soper J.W., Canfield D.V. (2006). Simultaneous analysis of cocaine, cocaethylene, and their possible metabolic and pyrolytic products. *Forensic Science International*, 157: 46-56.
- Carvalho V.M., Chasin A.A.M., Carvalho D.G. (2008). A study on the stability of anhydroecgonine methyl ester (crack biomarker), benzoylecgonine, and cocaine in human urine. *Revista de Psiquiatria Clínica*, 35: 17-20.
- Chasin A. A., Mídio A.F. (2000). The role of ethanol in cocaine concentration in human post-mortem whole blood. *Problems of Forensic Sciences*, 43: 171–183.
- Chawarski M.C., Fiellin D.A., O'Connor P.G., Bernard M., Schottenfeld R.S. (2007). Utility of sweat patch testing for drug use monitoring in outpatient treatment for opiate dependence. *Journal of Substance Abuse Treatment*, 33: 411-415.
- Chiasson M.A., Stoneburner R.L., Hildebrandt D.S., Ewing W.E., Telzak E., Jaffe H.W. (1991). Heterosexual transmission of HIV-1 associated with the use of smokable freebase cocaine (crack). *AIDS*, 5: 1121-1126.
- Cognard E., Bouchonnet S., Staub C. (2006). Validation of a gas-chromatography-ion trap tandem mass spectrometry for simultaneous analyse of cocaine and its metabolites in saliva. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 41: 925-934.
- Concheiro M., Gray T.R., Shakleya D.M., Huestis M.A. (2010). High-throughput simultaneous analysis of buprenorphine, methadone, cocaine, opiates, nicotine,

- and metabolites in oral fluid by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 398: 915-924.
- Concheiro M., Shakleya D.M., Huestis M.A. (2011). Simultaneous analysis of buprenorphine, methadone, cocaine, opiates and nicotine metabolites in sweat by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 400: 69-78.
- Cone E.J. (1998). Recent discoveries in pharmacokinetics of drugs of abuse. *Toxicology Letters*, 102-103: 97-101.
- Cone E.J., Lange R., Darwin W.D. (1998). In vivo adulteration: excess fluid ingestion causes false-negative marijuana and cocaine urine test results. *Journal of Analytical Toxicology*, 22: 460-473.
- Cone E.J., Sampson-Cone A.H., Darwin W.D., Huestis M.A., Oyler J.M. (2003). Urine testing for cocaine abuse: metabolic and excretion patterns following different routes administration and methods for detection of false-negatives results. *Journal of Analytical Toxicology*, 27: 386-401.
- Dadgar D., Burnett P. (1995). Issues in evaluation of bioanalytical method selectivity and drug stability. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 14: 23-31.
- Dams R., Murphy C.M., Lambert W.E., Huestis M.A. (2003). Urine drug testing for opioids, cocaine, and metabolites by direct injection liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 17: 1665-1670.

- Darke S., Duflou J. (2008). Toxicology and circumstances of death of homicide victims in New South Wales, Australia 1996-2005. *Journal of Forensic Sciences*, 53: 447-451.
- Dean R.A., Christian C.D., Sample R.H.B., Bosron W. F. (1991). Human liver cocaine ésterases: ethanol-mediated formation of ethylcocaine. *The FASEB Journal*, 5: 2735-2739.
- Decreto-Lei nº 44/2005 de 23 de Fevereiro em Diário da República, 1ª série – A, nº 38.
- Di Giovanni N., Marchetti D. (2012) Cocaine and its metabolites in the placenta: a systematic review of the literature. *Reproductive Toxicology*, 33: 1-14.
- Dolan K., Rouen D., Kimber J. (2004). An overview of the use of urine, hair, sweat and saliva to detect drug use. *Drug and Alcohol Review*, 23: 213-217.
- Drummer O.H. (2004). Postmortem toxicology of drugs of abuse. *Forensic Science International*, 142: 101-113.
- Drummer O.H. (2005). Review: pharmacokinetics of illicit drugs in oral fluid. *Forensic Science International*, 150: 133-142.
- Drummer O.H., Gerostamoulos J. (2002). Postmortem drug analysis: Analytical and toxicological aspects. *Therapeutic Drug Monitoring*, 24: 199-209.
- Duer W.C., Spitz D.J., McFarland S. (2006). Relationships between concentrations of cocaine and its hydrolysates in peripheral blood, heart blood, vitreous humor and urine. *Journal of Forensic Sciences*, 51: 421-425.

- Dunwiddie T.V. Mechanisms of cocaine abuse and toxicity: an overview. In: Clouet D., Asghar K., Brown R. Mechanisms of Cocaine Abuse and Toxicity. Rockville, EUA. National Institute on Drug Abuse Research Monograph 88, 1988, pp. 337-352.
- Dyke C.V., Stesin A., Jones R., Chuntharapai A., Seaman W. (1986) Cocaine increases natural killer cell activity. *The Journal of Clinical Investigation, Inc*, 77: 1387-1390.
- EMCDDA (2010). Cocaína e cocaína-crack *in* Relatório anual de 2010: a evolução do fenómeno da droga na Europa, Luxemburgo, cap. 5, pp. 69-78.
- EMCDDA (2013). Perspectives on drugs: emergency health consequences of cocaine use in Europe.
- EMCDDA (2015). Consumo de droga e problemas conexos *in* Relatório anual de 2015: Tendências e evoluções, Luxemburgo, cap. 2, pp. 39-59.
- Engelhart D.A., Jenkins A.J. (2002). Detection of cocaine analytes and opiates in nails from postmortem cases. *Journal of Analytical Toxicology*, 26: 489-492.
- Favrod-Coune T., Broers B. (2010). The health effect of psychostimulants: A literature review. *Pharmaceuticals*, 3: 2333-2361.
- Feng J., Wang L., Dai I., Harmon T., Bernet J.T. (2007). Simultaneous determination of multiple drugs of abuse and relevant metabolites in urine by LC-MS-MS. *Journal of Analytical Toxicology*, 31: 359-368.

- Feng J., Wang L., Dai I., Harmon T., Bernet J.T. (2007). Simultaneous determination of multiple drugs of abuse and relevant metabolites in urine by LC-MS-MS. *Journal of Analytical Toxicology*, 31: 359-368.
- Fernández P., Aldonza M., Bouzas A., Lema M., Bermejo A.M., Tabernero M.J. (2006). GC-FID determination of cocaine and its metabolites in human bile and vitreous humor. *Journal of Applied Toxicology*, 26: 253-257.
- Fineschi V., Centini F., Monciotti F., Turillazzi E. (2002). The cocaine “body stuffer” syndrome: a fatal case. *Forensic Science International*, 126: 7-10.
- Foltin R. W., Fischman M. W., Levin F. R. (1995) Cardiovascular effects of cocaine in humans: laboratory studies. *Drug and alcohol dependence*, 37: 193-210.
- Foltin R. W., Ward A. S., Haney M., Hart C. L., Collins E. D. (2003) The effects of escalating doses of smoked cocaine in humans. *Drug and alcohol dependence*, 70: 149-157.
- Gable R. S. (2004) Comparison of acute lethal toxicity of commonly abused psychoactive substances. *Addiction*, 99: 686-696.
- Gallardo E., Queiroz J.A. (2008). The role of alternative specimens in toxicological analysis. *Biomedical Chromatography*, 22: 795-821.
- Garcia R.C.T., Dati L.M.M., Fukuda S., Torres L.H.L., Moura S., Carvalho N.D., Carrettiero D.C., Camarini R., Levada-Pires A.C., Yonamine M., Negrini-Neto O., Abdalla F.M.F., Sandoval M.R.L., Afeche S.C., Marcourakis T. (2012).

- Neurotoxicity of anhydroecgonine methyl ester, a crack cocaine pyrolysis product. *Toxicological Sciences*, 128: 223-234.
- Gareri J., Klein J., Koren G. (2006). Drugs of abuse testing in meconium. *Clinica Chimica Acta*, 366: 101-111.
- Giorgi S.N., Meeker J.E. (1995) A 5-year stability study of common illicit drugs in blood. *Journal of Analytical Toxicology*, 19: 392-398.
- Goldstein R.A., DesLauriers C., Burda A.M. (2009) Cocaine: History, social implications, and toxicity – A review. *Disease-a-Month*, 55: 6-38.
- Gottardo R., Poletini A., Sorio D., Pascali J.P., Bortolotti F., Liotta E., Tagliaro F. (2008). Capillary zone electrophoresis (CZE) coupled to time-of-flight mass spectrometry (TOF-MS) applied to the analysis of illicit and controlled drugs in blood. *Electrophoresis*, 29: 4078-4087.
- Gray T., Huestis M. (2007). Bioanalytical procedures for monitoring in utero drug exposure. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 388: 1455-1465.
- Harris D.S., Everhart E.T., Mendelson J., Jones R.T. (2003). The pharmacology of cocaethylene in humans following cocaine and ethanol administration. *Drug and alcohol Dependence*, 72: 169-182.
- Hartmann C., Smeyers-Verbeke J., Massart D.L., McDowall R.D. (1998). Validation of bioanalytical chromatographic methods. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 17: 193-218.

- Heard K., Palmer R., Zahniser N.R. (2008). Mechanisms of acute cocaine toxicity. *The Open Pharmacology Journal*, 2: 70-78.
- Henderson G.L., Harkey M.R., Zhou C., Jones R.T., Jacob P., 3rd (1996). Incorporation of isotopically labeled cocaine and metabolites into human hair: 1. Dose-response relationships. *Journal of Analytical Toxicology*, 20: 1-12.
- Hippenstiel M.J., Gerson B. (1994) Optimization of storage conditions for cocaine and benzoylecgonine in urine: A review. *Journal of Analytical Toxicology*, 18: 104-109.
- Irwin K.L., Edlin B.R., Faruque S., McCoy H.V., Word C., Serrano Y., Inciardi J., Bowser B., Holmberg S.D. (1996). Crack cocaine smokers who turn to drug injection: characteristics, factors associated with injection, and implications for HIV transmission. *Drug and Alcohol Dependence*, 42: 85-92.
- Isenschmid D.S. (2010). Cocaine. In: Levine B., *Principles of Forensic Toxicology*, 3rd edition. AACCC Press, EUA, cap.16: 245-268.
- Isenschmid D.S., Levine B.S., Caplan Y.H. (1989) A comprehensive study of the stability of cocaine and its metabolites. *Journal of Analytical Toxicology*, 13: 250-256.
- Jagerdeo E., Abdel-Rehim M. (2009). Screening of cocaine and its metabolites in human urine samples by direct analysis in real-time source coupled to time-of-flight mass spectrometry after online preconcentration utilizing microextraction by packed sorbent. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 20: 891–899.

- Jagerdeo E., Montgomery M.A., Lebeau M.A., Sibum M. (2008). An automated SPE/LC/MS/MS method for the analysis of cocaine and metabolite in whole blood. *Journal of Chromatography B*, 874: 15-20.
- Janicka M., Kot-Wasik A., Namiesnik J. (2010). Analytical procedures for determination of cocaine and its metabolites in biological samples. *Trends in Analytical Chemistry*, 29: 209-224.
- Jeffcoat A.R., Perez-Reyes M., Hill J.M., Sadler B.M., Cook C.E. (1989). Cocaine disposition in humans after intravenous injection, nasal insufflation (snorting), or smoking. *Drug Metabolism and Disposition*, 17: 153-159.
- Jemionek J. (2010). Methods Validation. In: Levine B., *Principles of Forensic Toxicology*, 3rd edition. AACC Press, EUA, cap.10: 163-172.
- Johansen S.S., Bhatia H.M. (2007). Quantitative analysis of cocaine and its metabolites in whole blood and urine by high-performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 852: 338-344.
- Kacinko S.L., Barnes A.J., Schwilke E.W., Cone E.J., Moolchan E.T., Huestis M.A. (2005). Disposition of cocaine and its metabolites in human sweat after controlled cocaine administration. *Clinical Chemistry*, 51: 2085-2094.
- Kala S.V., Harris S.E., Freijo T.D., Gerlich S. (2008). Validation of analysis of amphetamines, opiates, phencyclidine, cocaine, and benzoylecgonine in oral

- fluids by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Analytical Toxicology*, 32: 605-611.
- Karch S.B., Stephens B., Ho C.H. (1998). Relating cocaine blood concentrations to toxicity—an autopsy study of 99 cases. *J autopsy and toxicology findings in a large group of men whose*. *Forensic Sciences*, 43:41–45.
- Kidwell D.A., Athanaselis S.A. (2005) Cocaine: methods of forensic analysis. In: Smith F.P., *Handbook of forensic drug analysis*. Elsevier Academic Press, Reino Unido, cap. 5:235-275.
- Kidwell D.A., Kidwell J.D., Shinohara F., Harper C., Roarty K., Bernadt K., McCaulley R.A., Smith F.P. (2003). Comparison of daily urine, sweat, and skin swabs among cocaine users. *Forensic Science International*, 133: 63-78.
- Kidwell D.A., Smith F.P. (2001). Susceptibility of PharmChek™ drugs of abuse patch to environmental contamination. *Forensic Science International*, 116: 89-106.
- Kiszka M., Buszewicz G., Madro R. (2000) Stability of cocaine in phosphate buffer na in urine. *Problems of Forensic Sciences*, 44: 7-23.
- Kiszka M., Buszewicz G., Madro R. (2001) Stability of cocaine in blood and in other tissues. *Problems of Forensic Sciences*, 45: 16-35.
- Klingmann A., Skoop G., Aderjan R. (2001) Analysis of cocaine, benzoylecgonine, ecgonine methyl éster, and ecgonine by high-pressure liquid chromatography-API mass spectrometry and application to a short-term degradation study of cocaine in plasma. *Journal of Analytical Toxicology*, 25: 425-430.

- Koehler S.A., Ladham S., Rozin L., Shakir A., Omalu B., Dominick J., Wecht C.H. (2005). The risk of body packing: a case of a fatal cocaine overdose. *Forensic Science International* 151: 81–84.
- Kovacic P. (2005). Role of oxidative metabolites of cocaine in toxicity and addiction: oxidative stress and electron transfer. *Medical Hypotheses*, 64: 350-356.
- Laizure S.C., Mandrell T., Gades N.M., Parker R.B. (2003). Cocaethylene metabolism and interaction with cocaine and ethanol: role of carboxylésterases. *Drug Metabolism and Disposition*, 31: 16-20.
- Lei nº 18/2007 de 17 de Maio em Diário da República, 1ª série, nº 95.
- Leikin, J.B., Paloucek F.P. Cocaine. In Leikin J.B., Paloucek F.P., *Poisoning and Toxicology Handbook*, 4th edition, 2008, pp. 84-85; 212-215, CRC Press, Boca Raton.
- Leri F., Bruneau J., Stewart J. (2003). Understanding polydrug use: review of heroin and cocaine co-use. *Society for the Study of Addiction to Alcohol and Other Drugs*, 98: 7-22.
- Levine B., Ramcharitar V., Smialek J.E. (1996) Stability of ecgonine methyl ester in postmortem urine specimens. *Journal of Forensic Sciences*, 41: 126-128.
- Liberty H.J., Johnson B.D., Fortner N. (2004). Detecting cocaine use through sweat testing: multilevel modeling of sweat patch length-of-wear data. *Journal of Analytical Toxicology*, 28: 667-673.

- Lin S., Moody D.E., Bigelow G.E., Foltz R.L. (2001) A validated liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization-tandem mass spectrometry method for quantification of cocaine and benzoylecgonine in human plasma. *Journal of Analytical Toxicology*, 25: 497-498.
- Logan B.K., Smirnow D., Gullberg R.G. (1997). Lack of predictable site-dependent differences and time-dependent changes in postmortem concentrations of cocaine, benzoylecgonine, and cocaethylene in humans. *Journal of Analytical Toxicology*, 20: 23-31.
- Lopez P., Martello S. Bermejo A.M., De Vincenzi E., Tabernero M.J., Chiarotti M. (2010). Validation of ELISA screening and LC-MS/MS confirmation methods for cocaine in hair after simple extraction. *Analytical and Biomedical Chemistry*, 397: 1539-1548.
- Mackey-Bojack S., Kloss J., Apple F. (2000). Cocaine, cocaine metabolite, and ethanol concentrations in postmortem blood and vitreous humor. *Journal of Analytical Toxicology*, 24: 59-65.
- Martin B.R., Lue L.P., Boni J.P. (1989). Pyrolysis and volatilization of cocaine. *Journal of Analytical Toxicology*, 13: 158-162.
- McCance-Katz E.F., Kosten T.R., Jatlow P. (1998). Concurrent use of cocaine and alcohol is more potent and potentially more toxic than use of either alone— A multiple-dose study. *Biological Psychiatry*, 44: 250-259.

- Meil W. M., Boja J. W. (2008). The Dopamine Transporter and Addiction. In: Karch S. B., *Neurochemistry of Abused Drugs*, 1st edition. CRC Press, EUA, cap.1:1-23.
- Mercolini L., Mandrioli R., Saladini B., Conti M., Baccini C., Raggi M.A. (2008). Quantitative analysis of cocaine in human hair by HPLC with fluorescence detection. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 48: 456-461.
- Merola G., Gentili S., Tagliaro F., Macchia T. (2010). Determination of different recreational drugs in hair by HS-SPME and GC/MS. *Analytical and Biomedical Chemistry*, 397: 2987-2995.
- Moeller M.R., Steinmeyer S., Kraemer T. (1998) Determination of drugs of abuse in blood. *Journal of Chromatography B*, 713: 91-109.
- Molina D.K. (2010). *Handbook of forensic toxicology for medical examiners*. CRC Press, Taylor & Francis Group, EUA.
- Moody D.E, Spanbauer A.C., Taccogno J.L., Smith E.K. (2004). Comparative analysis of sweat patches for cocaine (and metabolites) by radioimmunoassay and gas chromatography-positive ion chemical ionization-mass spectrometry. *Journal of Analytical Toxicology*, 28: 86-93.
- Moody D.E., Monti K.M., Spanbauer A.C. (1999) Long-term stability of abused drugs and antiabuse chemotherapeutical agents stored at -20°C. *Journal of Analytical Toxicology*, 23: 535-540.

- Moriya F., Hashimoto Y. (1996) Postmortem stability of cocaine and cocaethylene in blood and tissues of human and rabbits. *Journal of Forensic Sciences*, 41: 612-616.
- Mortier K.A., Maudens K.E., Lambert W.E., Clauwaert K.M., Van Bocxlaer J.F., Deforce D.L., Van Peteghem C.H., De Leenheer A.P. (2002). Simultaneous quantitative determination of opiates, amphetamines, cocaine and benzoylecgonine in oral fluid by liquid chromatography quadrupole-time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 779: 321-330.
- Musshoff F., Driever F., Lachenmeier K., Lachenmeier D.W., Banger M., Madea B. (2006). Results of hair analyses for drugs of abuse and comparison with self-reports and urine tests. *Forensic Science International* 156: 118–123.
- Musshoff F., Padosch S., Steinborn S., Madea B. (2004) Fatal blood and tissue concentrations of more than 200 drugs. *Forensic Science International*, 142: 161-210.
- Nakahara Y., Ishigami A. (1991). Inhalation efficiency of free-base cocaine by pyrolysis of 'crack' and cocaine hydrochloride. *Journal of Analytical Toxicology*, 14: 105-109.
- Narkowicz S., Plotka J., Polkowska Z., Biziuk M., Namiesnik J. (2013) Prenatal exposure to substance of abuse: a worldwide problem. *Environment International*, 54: 141-163.

- Nidikum-Moffor F.M., Schoeb T.R., Roberts S.M. (1998). Liver toxicity from norcocaine nitroxide, an N-oxidative metabolite of cocaine. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 284: 413-419.
- Norfolk G.A. (2007). The fatal case of a cocaine body-stuffer and a literature review – towards evidence based management. *Journal of Forensic and Legal Medicine*, 14: 49–52.
- Pasanen M., Pellinen P., Stenbgck F., Juvonen R. O., Raunio H., Pelkonen O. (1995). The role of CYP enzymes in cocaine-induced liver damage. *Archives of Toxicology*, 69: 287-290.
- Pehrsson A., Gunnar T., Engblom C., Seppä H., Jama A., Lillsunde P. (2008). Roadside oral fluid testing: comparison of the results of drugwipe 5 and drugwipe benzodiazepines on-site tests with laboratory confirmation results of oral fluid and whole blood. *Forensic Science International*, 175: 140-148.
- Pélissier-Alicot A.L., Gaulier J.M., Champsaur P., Marquet P. (2003). Mechanisms underlying postmortem redistribution of drugs: a review. *Journal of Analytical Toxicology*, 27: 533-544.
- Peters F., Drummer O.H., Musshoff F. (2007). Validation of new methods. *Forensic Science International*, 165: 216-224.
- Peters F.T. (2007) Stability of analytes in biosamples – an important issue in clinical and forensic toxicology? *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 388: 1505-1519.

- Pidoto R.R., Agliata A.M., Bertolini R., Mainini A., Rossi G., Giani, G. (2002). A new method of packaging cocaine for international traffic and implications for the management of cocaine body packers. *The Journal of Emergency Medicine*, 23: 149-153.
- Polla M., Stramesi C., Pichini S., Palmi I., Vignali C., Dall'Olio G. (2009). Hair testing is superior to urine to disclose cocaine consumption in drivers's licence regranting. *Forensic Science International*, 189: 41-43.
- Portaria nº 902-B/2007 de 13 de Agosto em Diário da República, 1ª série, nº 155.
- Rees K.A., Jones N.S., McLaughlin P.A., Seulin S., Leyton V., Yonamine M., Osselton M.D (2012) The effect of sodium fluoride preservative and storage temperature on the stability of cocaine in horse blood, sheep vitreous and deer muscle. *Forensic Science International*, 217: 182-188.
- Regenthal R., Krueger M., Koeppel C., Preiss R. (2000) Drug levels: Therapeutic and toxic serum/plasma concentrations of common drugs. *Journal of Clinical Monitoring and Computing*, 15: 529-544.
- Richardson T. (2000) Pitfalls in forensic toxicology. *Annals of Clinical Biochemistry*, 37: 20-44.
- Romolo F.S., Rotolo M.C., Palmi I., Pacifici R., Lopez A. (2003) Optimized conditions for simultaneous determination of opiates, cocaine and benzoylecgonine in hair samples by GC-MS. *Forensic Science International*, 138: 17-26.

- Rump A.F.E., Theisohn M., Klaus W. (1995) The pathophysiology of cocaine cardiotoxicity. *Forensic Science International*, 71: 103-115.
- Rush C.R., Baker R.W., Wright K. (1999) Acute physiological and behavioral effects of oral cocaine in humans: a dose response analysis. *Drug and alcohol dependence*, 55: 1-12.
- Saito T., Mase H., Takeichi S., Inokuchi S. (2007). Rapid simultaneous determination of ephedrine, amphetamines, cocaine, cocaine metabolites, and opiates in human urine by GC-MS. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 43: 358-363.
- Scheidweiler K.B., Cone E.J., Moolchan E.T., Huestis M.A. (2005). Dose-related distribution of codeine, cocaine, and metabolites into human hair following controlled oral codeine and subcutaneous cocaine administration. *The journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 313: 909-915.
- Scheidweiler K.B., Plessinger M.A., Shojaie J., Wood R.W., Kwong T.C. (2003). pharmacokinetics and pharmacodynamics of methylecgonidine, a crack cocaine pyrolyzate. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 307: 1179-1187.
- Schulz M., Iwersen-Bergmann S., Andresen H., Schmoldt A. (2012) Therapeutic and toxic blood concentrations of nearly 1,000 drugs and other xenobiotics. *Critical Care*, 16: 1-4.

- Schütz H., Erdmann F., Verhoff M.A., Weiler G. (2003) Pitfalls of toxicological analysis. *Legal Medicine*, 5: S6-S19.
- Sergi M., Bafile E., Compagnone D., Curini R., D'Ascenzo G., Romolo F.S. (2009). Multiclass analysis of illicit drugs in plasma and oral fluid by LC.MS/MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 393: 709-718.
- Shah V.P, Midha K.K., Findlay J.W.A., Hill H.M., Hulse J.D., McGilveray I.J., McKay G., Miller K.J., Patnaik R.N., Powell M.L., Tonelli A., Viswanathan C.T., Yacobi A. (2000). Bioanalytical method validation – A review with a decade of progress. *Pharmaceutical Research*, 17: 1551 -1557.
- SICAD (2012). Tendências por drogas *in* Relatório Anual 2012: a situação do país em matéria de drogas e toxicodependências, Lisboa, pp. 107-150.
- SICAD (2013). Tendências por drogas *in* Relatório Anual 2013: a situação do país em matéria de drogas e toxicodependências, Lisboa, pp.107 - 154.
- Simonsen K.W., Normann P.T., Ceder G., Vuori E., Thordardottir S., Thelander G., Hansen A.C., Teige B., Rollmann D. (2011). Fatal poisoning in drug addicts in the Nordic countries in 2007. *Forensic Science International*, 207: 170-176.
- Singer L., Farkas K., Klingman R. (1992) Childhood Medical and behavioral consequences of maternal cocaine use. *Journal of Pediatric Physiology*, 17: 389-406.
- Skoop G. (2004) Preanalytic aspects in postmortem toxicology. *Forensic Science International*, 142: 75-100.

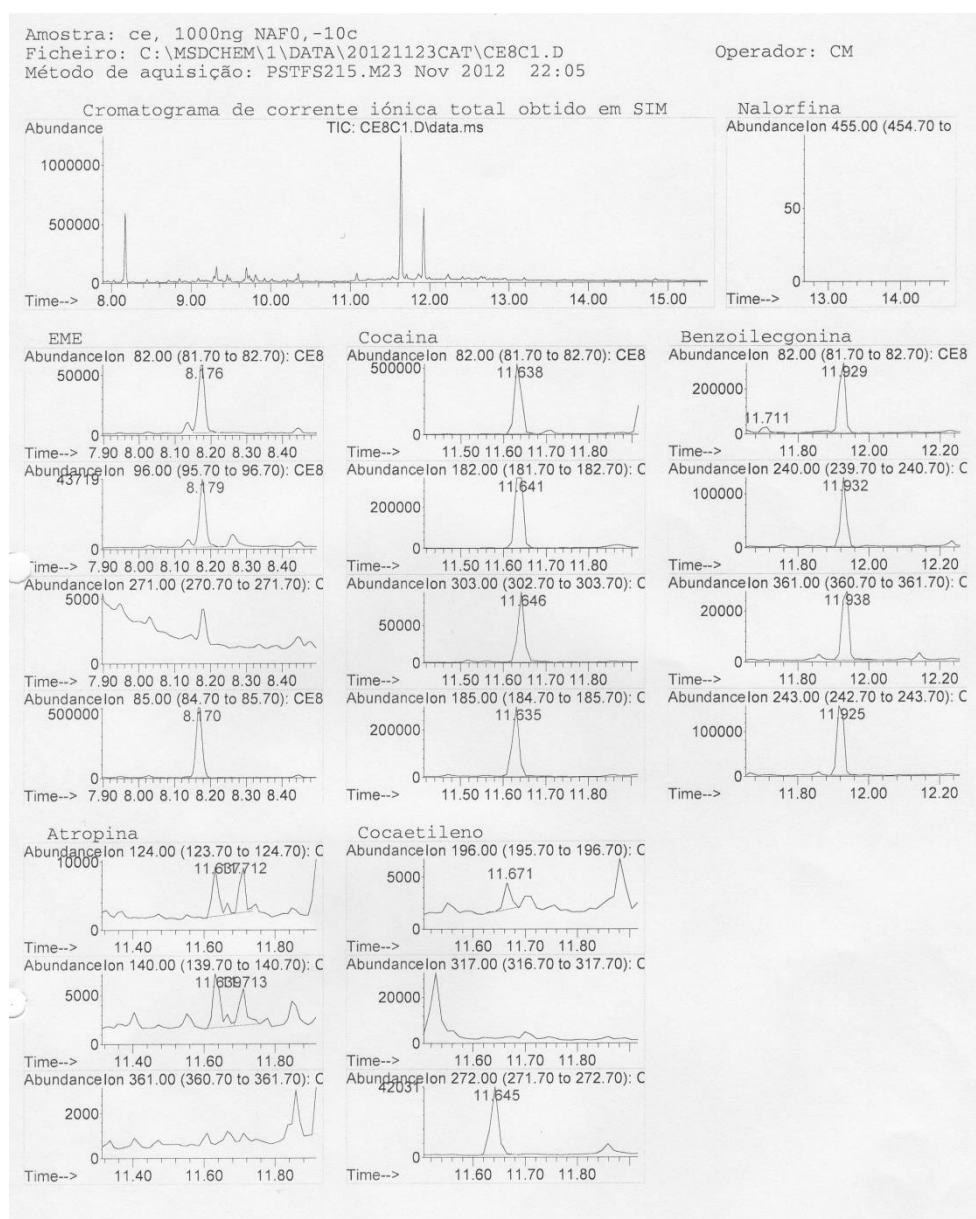
- Skoop G. (2010) Postmortem toxicology. *Forensic Science Medicine and Pathology*, 6: 314-325.
- Skoop G., Klingmann A., Pötsch L., Mattern R. (2001) In vitro stability of cocaine in whole blood and plasma including ecgonine as a target analyte. *Therapeutic Drug Monitoring*, 23: 174-181.
- Society of Hair Testing: Recommendations for hair testing in forensic cases (2004). *Forensic Science International*, 145: 83-84.
- Strano-Rossi S., Colamonici C., Botre F. (2008). Parallel analysis of stimulants in saliva and urine by gas-chromatography/mass spectrometry: perspectives for “in competition” anti-doping analysis. *Analytica Chimica Acta*, 606: 217-222.
- Su J. P., Li J. P., Li W., Altura B.T, Altura B. M. (2003) Cocaine induces apoptosis in cerebral vascular muscle cells: potential roles in strokes and brain damage. *European Journal of Pharmacology*, 482: 61-66.
- Thorpe L.E., Ouellet L.J., Hershow R., Bailey S.L., Williams I.T., Williamson J., Monterroso E.R., Garfein R.S. (2002). Risk of hepatitis C virus infection among young adult injection drug users who share injection equipment. *American Journal of Epidemiology*, 155: 645-653.
- Toennes S.W., Kauert G.F., Streinmeyer S., Moeller M.R. (2005). Driving under the influence of drugs – evaluation of analytical data of drugs in oral fluid, serum and urine, and correlation with impairment symptoms. *Forensic Science International*, 152: 149-155.

- Tsanaclis L., Wicks J.F. (2008). Differentiation between drug use and environmental contamination when testing for drugs in hair. *Forensic Science International*, 176: 19-22.
- Uchida K.K., Okuda S.N., Tamaka I.K. Method of inhibiting glycolysis in blood samples. U.S. Patent 4780419, Oct. 25, 1988.
- Ulrich S. (2000). Solid-phase microextraction in biomedical analysis. *Journal of Chromatography A*, 902: 167-194.
- UNODC (2014). Cocaine market in World Drug Report 2014, New York, cap. 1, pp. 37-48.
- UNODC (2015). Cocaine market in World Drug Report 2015, New York, cap. 1, pp. 37-48.
- Valente M.J., Carvalho F., Bastos M.L., Carvalho M., de Pinho P.G. (2010). Development and validation of a gas chromatography/ion trap-mass spectrometry method for simultaneous quantification of cocaine and its metabolites benzoylecgonine and norcocaine: application to the study of cocaine metabolism in human primary cultured renal cells. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 878: 3083-3088.
- Valente M.J., Carvalho F., Bastos M.L., Carvalho M., Pinho P.G. Chromatographic methodologies for analysis of cocaine and its metabolites in biological matrices in: Salih B., Çelikbıçak Ö., *Gas Chromatophy – Biochemicals, Narcotics and Essential Oils*. InTECH, Croácia, 2012, cap. 8, pp. 163-194.

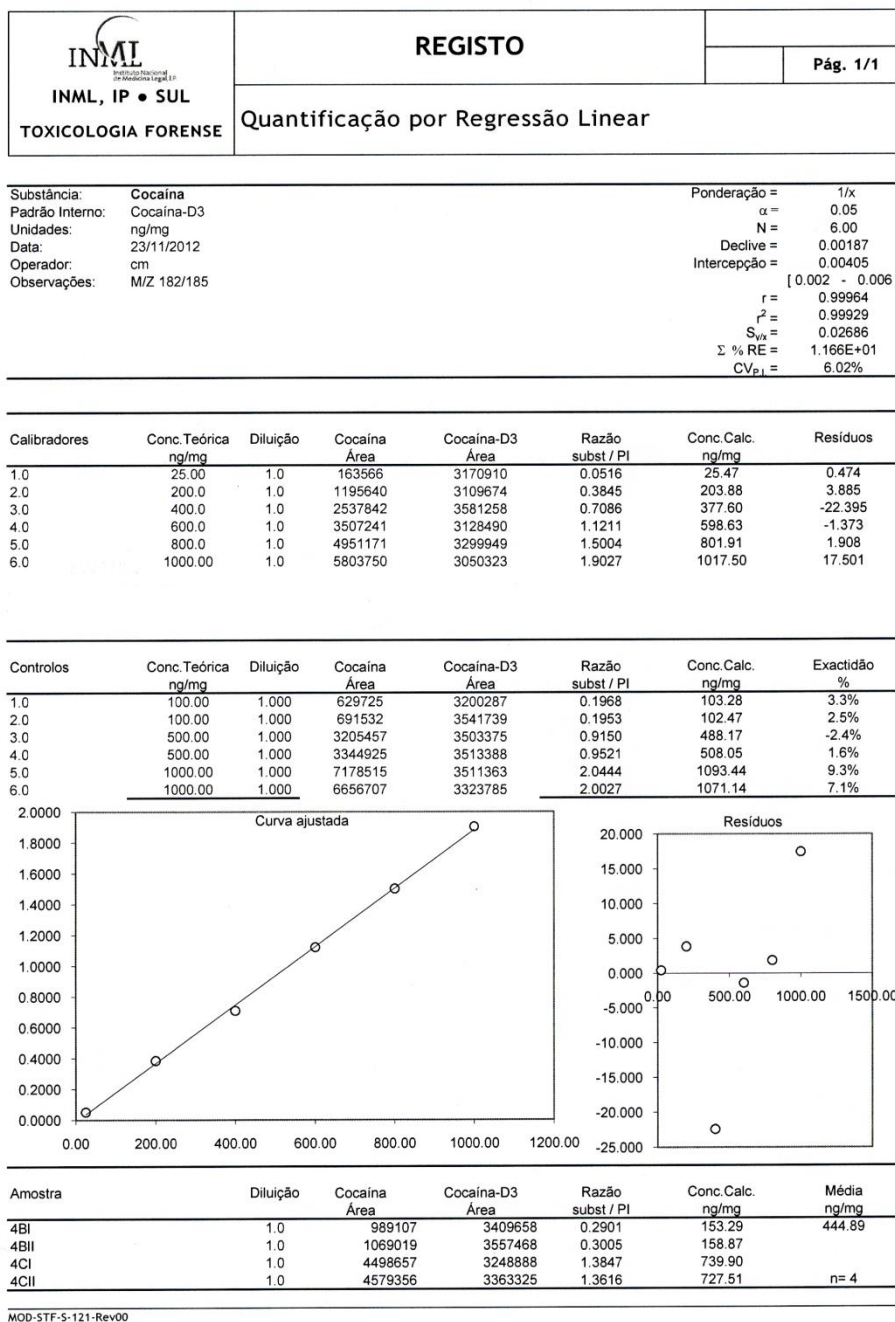
- Warner A., Norman B. (2000). Mechanisms of cocaine hydrolysis and metabolism in vitro and in vivo: A clarification. *Therapeutic Drug Monitoring*, 22: 226-270.
- White S.M., Lambe C.J.T. (2003) The Pathophysiology of cocaine abuse. *Journal of Clinical Forensic Medicine*, 10: 27-39.
- Winecker R.E., Goldberger B.A., Tebbett I., Behnke M., Eyler F.D., Conlon M., Wobie K., Karlix J., Bertholf R.L. (1997). Detection of cocaine and its metabolites in amniotic fluid and umbilical cord tissue. *Journal of Analytical Toxicology*, 21: 97-104.
- Xiong L., Wang R., Liang C., Cao F., Rao Y., Wang X., Zeng L., Ni C., Ye H., Zhang Y. (2013). Determination of ecgonine and seven other cocaine metabolites in human urine and whole blood by ultra-high-pressure liquid chromatography–quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 405: 9805-9816.
- Yamada H., Ishii Y., Oguri K. (2005). Metabolismo of drugs of abuse: its contribution to the toxicity and inter-individual differences in drug sensitivity. *Journal of Health Science*, 51: 1-7.
- Yawney J., Treacy S., Hindmarsh K.W., Burczynski F.J. (2002). A general screening method for acidic, neutral, and basic drugs in whole blood using the Oasis MCX® column. *Journal of Analytical Toxicology*, 26: 325-332.

XIII. ANEXOS

1. Exemplo de cromatograma obtido durante o estudo por SPE-GC-MS



2. Quantificação por regressão linear



3. Índice de figuras

Figura 1 - Estrutura química da cocaína.	25
Figura 2 - <i>Erythroxylum coca</i>	26
Figura 3 - Formas da cocaína: cloridrato (A) e livre (B).	29
Figura 4 - Mecanismo de ação da cocaína ao nível dos locais de ligação dos iões cloreto (Cl^-) e sódio (Na^+) no transportador de dopamina.	31
Figura 5 - Mecanismo de ação da cocaína nos canais de sódio (Na^+) da membrana dos neurónios.	32
Figura 6 - Metabolitos principais resultantes do metabolismo e da degradação <i>post mortem</i> ou <i>in vitro</i> da cocaína.	35
Figura 7 - Diagrama representativo da técnica de extração em fase sólida.	49
Figura 8 - Diagrama representativo do estudo do efeito da concentração inicial de cocaína, concentração de conservante, temperatura e tempo de armazenamento na estabilidade da cocaína.	71
Figura 9 - Diagrama representativo do estudo do efeito do ácido ascórbico, temperatura e tempo de armazenamento na estabilidade de cocaína.	73
Figura 11 - Diagrama representativo do estudo da estabilidade de cocaína após ciclos de congelação/ descongelação.	74
Figura 12 - Variação da percentagem de cocaína, benzoilecgonina e ecgonina metil éster ao longo do tempo (t) em amostras de <i>sangue post mortem</i> com 100 ng/mL de cocaína e 0 g/mL de NaF, 100 ng/mL de cocaína e 0,02 g/mL de NaF, 1000 ng/mL de cocaína e 0 g/mL de NaF e 1000 ng/mL de cocaína e 0,02 g/mL de NaF, sujeitas à temperatura ambiente, 2-8°C e -10°C.	84

Figura 13 - Variação da percentagem de cocaína, benzoilecgonina e ecgonina metil éster ao longo do tempo (t) em amostras de *sangue in vivo* com 100 ng/mL de cocaína e 0 g/mL de NaF, 100 ng/mL de cocaína e 0,02 g/mL de NaF, 1000 ng/mL de cocaína e 0 g/mL de NaF e 1000 ng/mL de cocaína e 0,02 g/mL de NaF, sujeitas à temperatura ambiente, 2-8°C e -10°C.....88

Figura 14 - Variação da percentagem de cocaína, benzoilecgonina e ecgonina metil éster ao longo do tempo (t) em amostras de *sangue post mortem* com 1000 ng/mL de cocaína, 0,02 g/mL de NaF às quais foi aplicado 0 mg/mL e 3 mg/mL de ácido ascórbico, sujeitas à temperatura ambiente, 2-8°C e -10°C.94

Figura 15 - Variação da percentagem de cocaína, benzoilecgonina e ecgonina metil éster ao longo do tempo (t) em amostras de *sangue in vivo* com 1000 ng/mL de cocaína, 0,02 g/mL de NaF às quais foi aplicado 0 mg/mL e 3 mg/mL de ácido ascórbico, sujeitas à temperatura ambiente, 2-8°C e -10°C.97

4. Índice de tabelas

Tabela 1 - Intervalos de tempo necessários para o início da observação dos efeitos provocados pela cocaína, para o momento em que se observam os seus efeitos máximos e a duração dos mesmos após o seu consumo pelas vias de administração intranasal, intravenosa e pulmonar.....	34
Tabela 2 - Concentrações da curva de calibração necessária para quantificação da cocaína e seus metabolitos.	79
Tabela 3 - Amostras de controlo de qualidade interno.....	80
Tabela 4 - Média, desvio-padrão, coeficiente de variação e recuperação das concentrações de cocaína obtidas em amostras com 1000 ng/mL de cocaína e 0,02 g/mL de fluoreto de sódio após o primeiro e terceiro ciclos de congelação/descongelação.	101
Tabela 5 - Média, desvio-padrão, coeficiente de variação e recuperação das concentrações de cocaína obtidas em extratos imediatamente após derivatização ou após 48h e 8 dias (d).....	102

5. Lista de abreviaturas e acrónimos

BSTFA	N,O-bis-trimetilsilil-trifluoroacetamida
COC	Cocaína
e.g.	Por exemplo (do latim, <i>exempli gratia</i>)
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético (do inglês, <i>Ethylenediaminetetraacetic Acid</i>)
EUA	Estados Unidos da América
GC	Cromatografia gasosa (do inglês, <i>Gas Chromatography</i>)
GC-MS	Cromatografia gasosa-espectrometria de massa (do inglês, <i>Gas Chromatography-Mass Spectrometry</i>)
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana (do inglês, <i>Human Immunodeficiency Virus</i>)
INMLCF, IP	Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses, I.P.
<i>m/z</i>	Razão massa/carga
MAO	Monoamina oxidase
MS	Espectrometria de massa (do inglês, <i>Mass Spectrometry</i>)
MSTFA	N-metil-N-trimetilsilil-trifluoroacetamida
NaF	Fluoreto de sódio
pH	Logaritmo negativo da concentração hidrogeniónica
Pi	Padrão interno
pp.	Páginas

ref.	Referência
SIM	Monitorização seletiva de iões (do inglês, <i>Selective Ion Monitoring</i>)
t	Tempo
T amb.	Temperatura ambiente
TMCS	Trimetilclorosilano
TMS	Trimetilsilil
Tr	Tempo de retenção
TrR	Tempo de retenção relativo

6. Lista de unidades

%	porcentagem
$\mu\text{g/g}$	micrograma por grama
$\mu\text{g/mL}$	micrograma por mililitro
μL	microlitro
μm	micrómetro
eV	elétron-volt
g	grama
g/mL	grama por mililitro
h	hora
kg	quilograma
M	molar
m	metro
mg	miligrama
mg/L	miligrama por litro
mg/mL	miligrama por mililitro
min	minuto
mL	mililitro
mL/min	mililitro por minuto
mm	milímetro

MΩ/cm	Megaohm por centímetro
ng/mL	nanograma por mililitro
°C	grau Celcius
°C/min	grau Celcius por minuto
r.p.m.	rotação por minuto
s	segundo
μA	microampere

